

Reference 5

Concise Explanation of WO98/35025

This publication discloses a carbonyl reductase derived from a *Candida* species which converts ethyl 4-chloroacetoacetate to ethyl (S)-4-chloro-3-hydroxybutanoate using NADPH as coenzyme but which is not significantly active on ethyl acetoacetate. The enzyme works at pH 5.5 to 6.5 and at 50 to 55°C. It is stable for at least 30 minutes at 40°C at pH 7. It is inhibited by mercury ions and by quercetin and has a molecular weight of 76kDa by gel filtration and 32kDa by sodium dodecyl-sulphate (SDS)-PAGE.

The present invention relates to a method for producing (S)-4-halo-3-hydroxybutyric acid ester comprising asymmetrically reducing 4-halo-acetoacetic acid ester or its derivatives with β -ketoacyl-acyl carrier protein reductase constituting Type II fatty acid synthase.

Fatty acid synthase is structurally classified into four types, IA, IB, IC, and II. Yeasts and fungi have Type IB synthase. The enzyme of the present invention is a β -ketoacyl-ACP reductase classified into Type II fatty acid synthase, which is simpler in the structure and functions, smaller in molecular weight (MW of subunit about 20,000 to 40,000) and not inhibited by SH reagents such as mercury ions as compared with Type IA, Type IB, and Type IC synthases.

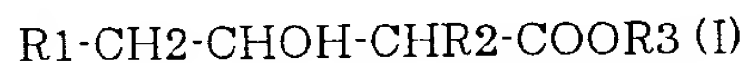
Abstract (Basic): WO 9835025 A

A carbonyl reductase is derived from a *Candida* species (especially *Candida magnoliae* IFO 0705), and converts ethyl 4-chloroacetoacetate to ethyl (S)-4-chloro-3-hydroxybutanoate using NADPH as coenzyme, but is not significantly active on ethyl acetoacetate. It has working pH 5.5 to 6.5 and working temperature 50-55 deg. C. It is stable for at least 30 minutes at 40 deg. C at pH 7. It is inhibited by mercury ions and by quercetin and has a molecular weight of 76 kDa by gel filtration and 32kDa by sodium dodecyl-sulphate (SDS)-PAGE.

Also claimed are:

- (1) enzymes derived from this carbonyl reductase by addition, deletion or substitution of one or more amino acid residues in its sequence;
- (2) DNA encoding the carbonyl reductase and these modified forms;
- (3) plasmid vectors (such as pNTS1) containing the DNA, and
- (4) transformed host cells (such as *Escherichia coli* HB101(pNTS1)) containing the vectors.

The plasmid vectors may also contain a glucose dehydrogenase (such as that from *Bacillus megaterium*). This vector is pNTS1G. The enzyme (or cultures of transformant cells which express it) can be used for the production of (S)-4-halo-3-hydroxybutanoate esters of formula (I) from 4-haloacetoacetate esters of formula (II).



R1 = halo (such as Cl or Br);

R2 = H

R3 = optionally substituted alkyl or aryl (preferably 1-4C alkyl such as methyl or ethyl).

Transformant cells which express both the carbonyl reductase and glucose dehydrogenase reduce acetoacetate esters of formula (II) to (I) (where R1, R2 = H, halo, azido or benzylamino, with the proviso that one of R1, R2 is H but not both).

USE - The process provides sufficient production of optically active 3-hydroxybutanoate esters for use as synthetic intermediates for pharmaceuticals.

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 C12N 9/02, 15/53, 15/63, 1/21, C12P 7/62 // (C12N 9/02, C12R 1:91) (C12P 7/62, C12R 1:91)	A1	(11) 国際公開番号 WO98/35025 (43) 国際公開日 1998年8月13日(13.08.98)
(21) 国際出願番号 (22) 国際出願日 PCT/JP97/03051 1997年9月1日(01.09.97) (30) 優先権データ 特願平9/25667 1997年2月7日(07.02.97) JP 特願平9/113052 1997年4月30日(30.04.97) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 鐘淵化学工業株式会社(KANEKA CORPORATION)[JP/JP] 〒530 大阪府大阪市北区中之島三丁目2番4号 Osaka, (JP) (72) 発明者: および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 八十原良彦(YASOHARA, Yoshihiko)[JP/JP] 〒670 兵庫県姫路市日山町3丁目7番2-605 Hyogo, (JP) 木崎憲之(KIZAKI, Noriyuki)[JP/JP] 〒676 兵庫県高砂市高砂町沖浜町2-63 Hyogo, (JP) 長谷川淳三(HASEGAWA, Junzo)[JP/JP] 〒674 兵庫県明石市大久保町高丘2丁目13-4 Hyogo, (JP) 和田 大(WADA, Masaru)[JP/JP] 〒606 京都府京都市左京区田中飛鳥井町132 薄木マンション305 Kyoto, (JP) 清水 昌(SHIMIZU, Sakayu)[JP/JP] 〒616 京都府京都市右京区常盤山下町6番地の9 Kyoto, (JP) 片岡道彦(KATAOKA, Michihiko)[JP/JP] 〒606 京都府京都市左京区一乗寺西水干町32-1 ハイジコスモ227 Kyoto, (JP)	山本和彦(YAMAMOTO, Kazuhiko)[JP/JP] 〒569 大阪府高槻市日吉台4番町25-1 日本たばこ産業株式会社 日吉台寮3-5 Osaka, (JP) 川端 潤(KAWABATA, Hiroshi)[JP/JP] 〒606 京都府京都市左京区岩倉忠在地町509 アプレスト岩倉1204 Kyoto, (JP) 喜多恵子(KITA, Keiko)[JP/JP] 〒680 鳥取県鳥取市湖山町北3丁目251番地 合同宿舎湖山住宅3-105 Tottori, (JP) (74) 代理人 弁理士 山本秀策(YAMAMOTO, Shusaku) 〒540 大阪府大阪市中央区城見一丁目2番27号 クリスタルタワー15階 Osaka, (JP) (81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO特許 (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). 添付公開書類 国際調査報告書	
(54) Title: NOVEL CARBONYL REDUCTASE, GENE THAT ENCODES THE SAME, AND METHOD OF UTILIZING THESE (54) 発明の名称 新規カルボニル還元酵素、およびこれをコードする遺伝子、ならびにこれらの利用方法 (57) Abstract An enzyme having the activity of asymmetrically reducing a carbonyl compound to an optically active alcohol, a DNA which encodes the enzyme, a plasmid having the DNA, cells transformed by the plasmid, and a process for producing optically active alcohols with the enzyme and/or the transformed cells. <div style="text-align: center; margin-top: 100px;"> <i>Candida meze n domiensis</i> Temp 40K. 2000 ARB. 1 </div>		

(57) 要約

カルボニル化合物を不斉的に還元して光学活性アルコールを生成するカルボニル還元活性を有する酵素、この酵素をコードするDNA、このDNAを有するプラスミド、このプラスミドで形質転換された形質転換細胞、ならびにこの酵素および／またはこの形質転換細胞を用いる光学活性アルコールの製造方法が提供される。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード (参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SN	セネガル
AM	アルメニア	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SD	スーダン
AT	オーストリア	GB	イギリス	LV	ラトヴィア	TD	チャド
AU	オーストラリア	GE	ジョージア	MC	モナコ	TG	トーゴ
AZ	アゼルバイジャン	GH	ガーナ	MD	モルドバ	TJ	タジキスタン
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BB	バルバドス	GW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア共和国	TR	トルコ
BE	ベルギー	GR	ギリシャ	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
BG	ブルガリア	RU	ロシア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
BJ	ベナン	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
BR	ブラジル	IL	イスラエル	MW	マラウイ	US	米国
BY	ベラルーシ	IS	アイスランド	MX	メキシコ	VN	ベトナム
CA	カナダ	IT	イタリア	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラヴィア
CC	中央アフリカ共和国	JP	日本	NL	オランダ	ZW	ジンバブエ
CH	スイス	KE	ケニア	NO	ノルウェー		
CI	コートジボワール	KR	韓国	NZ	ニュージーランド		
CM	カメルーン	PR	プエルトリコ	PL	ポーランド		
CN	中国	PZ	パナマ	PT	ポルトガル		
CO	コロンビア	RR	ルーマニア	RO	ルーマニア		
CY	キプロス	RZ	リビア	RU	ロシア		
CZ	チェコ	LC	レソト	SD	スーダン		
DE	ドイツ	LL	リベリア	SE	スウェーデン		
DK	デンマーク	LR	リベリア	SI	スロベニア		
EE	エストニア	LS	レソト	SK	スロバキア		
ES	スペイン			SL	シエラレオネ		

明細書

新規カルボニル還元酵素、およびこれをコードする遺伝子、ならびにこれらの利用方法

5 技術分野

本願発明は、カルボニル化合物を不斉的に還元して光学活性アルコールを生成するカルボニル還元活性を有する酵素（以下、CRD酵素という）、この酵素をコードするDNA、このDNAを有するプラスミド、このプラスミドで形質転換された形質転換細胞、ならびにこの酵素および／またはこの形質転換細胞を用いる光学活性アルコールの製造方法に関する。得られる光学活性アルコール、例えば、(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルは、医薬・農薬等の合成原料として有用な化合物である。

10 背景技術

15 CRD酵素は多数知られている（有機合成化学 49, 52, (1991)、Eur. J. Biochem. 184, 1, (1981)）。このうち、4-ハロアセト酪酸エステルに作用し(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルを生成する微生物由来の酵素であり、かつその性質まで報告されているものとしては、*Geotrichum candidum*（ゲオトリカム・キャンディダム）由来の酵素(Enzyme Microb. Technol., (1992), vol. 14, 731)、および

20 *Candida parapsilosis*（キャンディダ・パラプシロシス）由来の酵素(Enzyme Microb. Technol., (1993), vol. 15, 950) のみが挙げられる。これら2種類の酵素をコードする遺伝子に関する情報は報告されていない。これらの酵素を用いた4-ハロアセト酪酸エステルの還元反応は低濃度でしか進行しないので、これらの酵素を触媒とした(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルの合成は実用的ではない。

25 4-ハロアセト酪酸エステルの不斉還元反応としては、上記2種類の酵素を用いる反応の他に、微生物菌体およびその処理物を利用する反応が多数知られている

(特許公報第1723728号、特開平6-209782号、同6-38776号など)。しかし、これらの反応においても高い基質濃度での反応は行われていないので、実用的な製造方法が確立されているとはいいがたい。例えば、有機溶媒との2相系で反応を行う方法を参照のこと(特許公報第2566962号)。ルテニウム-光学活性ホスフィン錯体を触媒として用いる例も報告されている(特開平1-211551)が、これは、高圧反応容器を必要とすること、高価な触媒を用いるなどの多くの課題を有している。

このように、4-ハロアセト酢酸エステルなどのカルボニル化合物を不斉的に還元して(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルなどの光学活性アルコールを製造するために実用的な酵素の開発が望まれていた。

C R D 酵素は、その反応に還元型補酵素を必要とする。従来、C R D 酵素を有する微生物菌体等を用いてカルボニル化合物の還元反応を行う際には、反応系にグルコース等の糖類を添加して、酸化された補酵素を還元型に変換する再生系の酵素群を機能させることにより、補酵素を再生し、これを還元反応に利用していた。しかし、これらの再生系の酵素群は、基質や還元反応生成物による阻害やダメージを受ける場合が多い。このことが、基質または生成物が低濃度の場合にしか該還元反応が進行しない主な原因の1つであると考えられてきた。C R D 酵素を用いてカルボニル化合物を不斉的に還元する際に、C R D 酵素が依存する補酵素を再生する能力を有する酵素とC R D 酵素とを組み合わせる反応を行うことにより、高価な補酵素の使用量を大幅に減らし得ることが知られている(特許公報第2566960号、Enzyme Microb. Technol., (1993), vol. 15, 950など)。しかし、その場合、補酵素の再生を担う酵素源をC R D 酵素とは別に調製した後、反応系内に添加する必要があった。

本願発明者らは、新たなキャンディダ(Candida)属由来のC R D 酵素を見出し、このC R D 酵素を使用することにより、カルボニル化合物から効率良く光学活性アルコールを製造し得ることを見いだした。

補酵素を再生する能力を有する酵素の遺伝子（例えば、グルコース脱水素酵素遺伝子）を同時に含有する形質転換細胞を使用することにより、光学活性アルコールを効率よく製造し得ることを見出した。

従って、本明細書に記載の本願発明は、新規なCRD酵素、この酵素をコードするDNA、このDNAを有するプラスミド、このプラスミドで形質転換された形質転換細胞、ならびにこの酵素および／またはこの形質転換細胞を用いる光学活性アルコールの製造方法を提供する利点を可能にする。

発明の開示

10 本願発明のカルボニル還元酵素は、以下の（１）から（４）の理化学的性質を有する：

（１）作用：

NADPHを補酵素として、4-クロロアセト酢酸エチルに作用し、(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチルを生成する、

15 （２）基質特異性：

4-クロロアセト酢酸エチルに対して強い活性を示し、アセト酢酸エチルには実質的に活性を示さない、

（３）至適pH：pH5.5～6.5、および

（４）作用至適温度：50℃～55℃。

20 1つの実施態様において、前記カルボニル還元酵素は、さらに、以下の（５）から（７）の理化学的性質を有する：

（５）熱安定性：pH7.0で30分間処理したときに約40℃まで安定である、

（６）阻害剤：水銀イオン、クエルセチンにより阻害される、および

25 （７）分子量：ゲル濾過分析において約76,000、SDSポリアクリルアミド電気泳動分析において約32,000。

本願発明のカルボニル還元酵素は、配列表の配列番号1のアミノ酸配列または

配列表の配列番号 1 のアミノ酸配列において 1 または数個のアミノ酸が欠失、置換、または付加されたアミノ酸配列あるいはその一部を有する酵素であって、4-クロロアセト酢酸エチルを不斉的に還元して(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチルを生成する活性を有する。

- 5 1つの実施態様においては、前記酵素はカンディダ (Candida) 属の微生物に由来する。好適な実施態様においては、前記酵素はカンディダ・マグノリエ (Candida magnoliae) に由来する。さらに好適な実施態様においては、前記酵素はカンディダ・マグノリエ (Candida magnoliae) IF0 0705株に由来する。

- 10 本願発明のDNAは、前記酵素をコードする。1つの実施態様においては、前記DNAは、配列表の配列番号 2 のヌクレオチド配列を有する。

本願発明のプラスミドは、前記DNAを有する。1つの実施態様においては、前記プラスミドはpNTS1である。

- 15 本願発明の形質転換細胞は、前記プラスミドにより形質転換された形質転換細胞である。1つの実施態様においては、前記形質転換細胞は大腸菌である。好適な実施態様においては、前記形質転換細胞は、E. coli HB101 (pNTS1) である。

本願発明のプラスミドは、4-クロロアセト酢酸エチルを不斉的に還元して(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチルを生成する活性を有する酵素をコードするDNAおよびこの酵素が依存する補酵素を再生する能力を有する酵素（例えば、グルコース脱水素酵素）をコードするDNAを有する。

- 20 1つの実施態様においては、前記グルコース脱水素酵素は、バシラス・メガテリウム (Bacillus megaterium) に由来する。好適な実施態様においては、前記プラスミドはpNTS1Gである。

本願発明の形質転換細胞は、前記プラスミドにより形質転換された形質転換細胞である。

- 25 1つの実施態様においては、前記形質転換細胞は大腸菌である。好適な実施態様においては、前記形質転換細胞はE. coli HB101 (pNTS1G) である。

本願発明の形質転換細胞は、4-クロロアセト酢酸エチルを不斉的に還元して
(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチルを生成する活性を有する酵素をコードす
るDNAを有する第一のプラスミドおよびこの酵素が依存する補酵素を再生する
能力を有する酵素（例えば、グルコース脱水素酵素）をコードするDNAを有す
5 第二のプラスミドにより形質転換された形質転換細胞である。

1つの実施態様においては、前記形質転換細胞は、プラスミドpNTS1と、バシ
ラス・メガテリウム（*Bacillus megaterium*）に由来するグルコース脱水素酵素
をコードするDNAを有するプラスミドとにより形質転換された形質転換細胞で
ある。好適な実施態様においては、前記形質転換細胞は大腸菌である。

10 本願発明の光学活性3-ヒドロキシ-酪酸エステル類の製造方法は、3-オキソ-酪
酸エステル類を不斉的に還元して、光学活性3-ヒドロキシ-酪酸エステル類を生
成する活性を有する酵素あるいは該酵素の産生能を有する微生物の培養物あるい
はその処理物と、3-オキソ-酪酸エステル類とを反応させる工程、および生成し
た光学活性3-ヒドロキシ-酪酸エステル類を採取する工程を包含する。

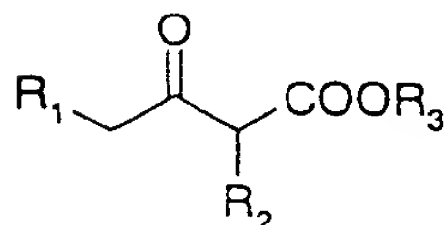
15 本願発明の光学活性3-ヒドロキシ-酪酸エステル類の製造方法は、3-オキソ-酪
酸エステル類を不斉的に還元して、光学活性3-ヒドロキシ-酪酸エステル類を生
成する活性を有する酵素をコードするDNAを有するプラスミドで形質転換され
た形質転換細胞と、3-オキソ-酪酸エステル類とを反応させる工程、および生成
した光学活性3-ヒドロキシ-酪酸エステル類を採取する工程を包含する。

20 本願発明の光学活性アルコールの製造方法は、カルボニル化合物を不斉的に還
元して光学活性アルコールを生成する活性を有する酵素をコードするDNAおよ
びこの酵素が依存する補酵素を再生する能力を有する酵素をコードするDNAを
有するプラスミドで形質転換された形質転換細胞と、カルボニル化合物とを反応
させる工程、ならびに生成した光学活性アルコールを採取する工程を包含する。

25 本願発明の光学活性アルコールの製造方法は、カルボニル化合物を不斉的に還
元して光学活性アルコールを生成する活性を有する酵素をコードするDNAを有

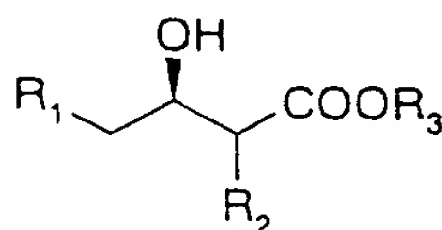
する第一のプラスミドおよびこの酵素が依存する補酵素を再生する能力を有する酵素をコードするDNAを有する第二のプラスミドで形質転換された形質転換細胞と、カルボニル化合物とを反応させる工程、ならびに生成した光学活性アルコールを採取する工程を包含する。

5 1つの実施態様において、前記カルボニル化合物は以下の一般式：



で表される3-オキソ-酪酸エステル類であり、得られる光学活性アルコールは以下の一般式：

10



で表される光学活性3-ヒドロキシ-酪酸エステル類である。

好適な実施態様において、前記一般式において、R1およびR2はそれぞれ独立して、ハロゲン、アジド、ベンジルアミノまたは水素であり、ここでR1またはR2の
15 いずれか一方が水素であり、そしてR3は置換または非置換のアルキル基またはアリール基である。

より好適な実施態様において、前記一般式において、R1は塩素であり、R2は水素であり、そしてR3はエチルである。

好適な実施態様において、前記一般式において、R1およびR2がそれぞれ独立して、アルキル基、水酸基または水素であり、ここでR1またはR2のいずれか一方が
20 水素であり、そしてR3が置換または非置換のアルキル基またはアリール基である。

より好適な実施態様において、前記一般式において、R1は水酸基であり、R2は水素であり、そしてR3はエチルである。

図面の簡単な説明

- 5 図1は、塩基配列および推定アミノ酸配列を示す図である。
 図2は、組換えプラスミドpNTSIGの作製方法を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下、更に詳細に本願発明を説明する。

10 (CRD酵素の精製)

- 本願発明に含まれるCRD酵素の起源として用いられる生物は特に限定されないが、例えばカンディダ (Candida) 属酵母が挙げられ、特に好ましいカンディダ (Candida) 属酵母としてはカンディダ・マグノリエ (Candida magnoliae) IF0 0705を挙げることができる。カンディダ・マグノリエ (Candida magnoliae) IF0 0705は、もとは、Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS; Oosterstraat 1, Postbus 273, NL-3740 AG Baarn, Netherlands) にCBS166の番号の下で寄託されていた微生物であり、その単離および性質は、「The Yeasts, a Taxonomic Study, 3rd ed.」 pp.731 (1984)に記載されている。本願発明の酵素を生産し得る微生物は、野生株または変異株のいずれでもあり得る。あるいは、細胞融合または遺伝子操作等の遺伝学的手法により誘導される微生物も用いられ得る。遺伝子操作された本願酵素を生産する微生物は、例えば、これらの酵素を単離および/または精製して酵素のアミノ酸配列の一部または全部を決定する工程、このアミノ酸配列に基づいて酵素をコードするDNA配列を得る工程、このDNAを他の微生物に導入して組換え微生物を得る工程、およびこの組換え微生物を培養して、本願発明の酵素を得る工程を包含する方法により得られ得る。

 本願発明の酵素を得るための (または本願発明の(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪

酸エステルの製造方法に用いられる) 微生物のための培養培地は、その微生物が増殖し得るものである限り特に制限されない。例えば、炭素源、窒素源、無機塩類、有機栄養素等を含有する通常の液体栄養培地が使用され得る。

「微生物の培養物」とは、微生物の菌体、あるいは菌体を含む培養液を意味し、
5 「その処理物」は、例えば下記のように抽出および精製されたものを意味する。

得られた培養物からの酵素の抽出および精製のためには、当業者に通常用いられ得る酵素の抽出精製法が用いられ得る。例えば、培養液から菌体を遠心分離した後、菌体を適当な緩衝液中に懸濁し、該菌体をガラスビーズ等の物理的手法、酵素等の生化学的手法等を用いて破碎または溶解し、さらに遠心分離により該溶
10 液中の固形物を除去することにより、酵素の粗酵素液を得ることができる。あるいは、培養液から、上記と同様の精製法で、粗酵素液を得ることができる。

上記粗酵素液を当業者が通常用いる手法、例えば、硫酸アンモニウム沈殿、透析、クロマトグラフィーを単独でまたは組み合わせて用いてさらに精製し得る。クロマトグラフィーは、疎水クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー
15 (例えば、DEAEセファロース)、ゲル濾過等の各種クロマトグラフィーを単独で、または組み合わせて用いることにより、本願発明の酵素を得ることができる。

例えば、CRD酵素はキャンディダ・マグノリエ (*Candida magnoliae*) IFO 0705から以下のように単離され得る。

まず、この酵母を適切な培地で培養し、培養液から遠心分離により菌体を集める。菌体を例えば、ダイノミル (Dyno-Mill社製) などで破碎し、遠心分離にて
20 菌体残渣を除き、無細胞抽出液を得る。この無細胞抽出液に、例えば、塩析 (硫酸アンモニウム沈殿、リン酸ナトリウム沈殿など)、溶媒沈殿 (アセトンまたはエタノールなどによる蛋白質分画沈殿法)、透析、ゲル濾過、イオン交換、逆相等のカラムクロマトグラフィー、限外濾過等の手法を単独で、または組み合わせて
25 て用いて、酵素が精製され得る。CRD酵素活性は、100mMリン酸緩衝液 (pH6.5) に、基質4-クロロアセト酢酸エチル1mM、補酵素NADPH0.1mMおよび酵素を添加

して、または、200mMリン酸緩衝液 (pH7.0) に、基質4-クロロアセト酢酸エチル 0.2mM、補酵素NADPH 0.32mMを添加して、30℃で波長340nmの吸光度の減少を測定することにより行い得る。この反応条件に於いて、1分間に1 μ molのNADPHをNADPに酸化する酵素活性を1 unitと定義する。

- 5 本願発明において、酵素が「安定である」とは、pH7.0で、40℃、30分間処理したときに、処理前の90%またはそれ以上の活性が残存していることをいう。

酵素の分子量の測定は、TSK-G3000SW (φ0.75×60cm) (東ソー株式会社製) カラムを用いたゲル濾過により行う。溶離液としては、0.1M Na_2SO_4 、0.05% Na_2N_3 を含む0.1Mリン酸緩衝液 (pH7.0) を用いる。サブユニットの分子量は、還元条件下 (還元剤2V/V% 2-メルカプトエタノール) で、10% SDS-ポリアクリルアミドゲルでの電気泳動を行い、そして標準タンパク質の相対移動度から算出することにより決定される。

例えば、本願発明の配列番号1に示すアミノ酸配列を有するCRD酵素は、以下の(1)から(4)の理化学的性質を有する：

- 15 (1) 作用：

NADPHを補酵素として、4-クロロアセト酢酸エチルに作用し、(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチルを生成する、

- (2) 基質特異性：

4-クロロアセト酢酸エチルに対して強い活性を示し、アセト酢酸エチルには実質的に活性を示さない、

- (3) 至適pH：pH5.5～6.5、

- (4) 作用至適温度：50℃～55℃。

1つの実施態様においては、本願発明の配列番号1に示すアミノ酸配列を有するカルボニル還元酵素はさらに、以下の(5)から(7)の理化学的性質を有する：

- (5) 熱安定性：pH7.0で30分間処理したときに約40℃まで安定である、

(6) 阻害剤：水銀イオン、クエルセチンにより阻害される、

(7) 分子量：ゲル濾過分析において約76,000、SDSポリアクリルアミド電気泳動分析において約32,000。

5 本願発明の酵素とほぼ同一の性質を有する酵素は、天然酵素であってもよく、または組換え酵素であってもよい。例えば、組換え酵素は、キャンディダ・マグノリエ IF0 0705株に由来する酵素のアミノ酸配列中の1つまたは数個のアミノ酸を置換、欠失、挿入または付加させることにより作製し、そしてその酵素活性を測定することより、得られ得る。

10 (合成オリゴヌクレオチドプローブの作製)

上記で得られた精製CRD酵素を変性（例えば、8M尿素）した後、エンドペプチダーゼ（例えば、リシルエンドペプチダーゼ）で消化し、得られたペプチド断片のアミノ酸配列をエドマン法により決定する。このアミノ酸配列に基づいて、DNAプローブを合成する。プローブは、例えば、³²Pで標識して用いられ得る。

15

(遺伝子ライブラリーの作製)

本願発明のCRD酵素を産生する微生物の染色体DNAまたはcDNAを、適切な制限酵素、例えば、Sau3AIで部分消化し、この消化物のうち適切な大きさ（例えば、23kbから20kb）のDNA断片を、例えば、ファージベクターの適合性の制限酵素部位に挿入し、得られる組換えファージベクターを、インビトロパッケージングした後、大腸菌に感染させ、遺伝子ライブラリーが作製され得る。

20

(遺伝子ライブラリーからのCRD酵素遺伝子のクローニング)

作製した遺伝子ライブラリーを、³²P標識した合成DNAプローブを用いて、ブ
25 ラーク・ハイブリダイゼーション法（Science, 196, 180 (1977)）により、CRD酵素遺伝子についてスクリーニングし得る。得られたDNAの塩基配列分析は、

ジデオキシ・シーケンス法、またはジデオキシ・チェイン・ターミネーション法などにより決定することができる。配列決定は、例えば、ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer社製) およびABI 373A DNA Sequencer (Applied Biosystems社製) を用いて行われ得る。

5 得られたDNA断片は、PCR法などで増幅されて、クローニングされ得る。

(CRD酵素遺伝子を含む組換えプラスミドの作製)

CRD酵素遺伝子を宿主微生物内に導入し、それをその導入された宿主微生物内で発現させるために用いられるベクターDNAとしては、適切な宿主微生物内で
10 このCRD酵素遺伝子を発現させ得る限り、任意のベクターDNAが用いられ得る。このようなベクターDNAとしては、例えば、プラスミドベクター、ファージベクター、コスミドベクターなどが挙げられる。また、他の宿主株との間で遺伝子交換が可能なシャトルベクターも使用され得る。さらに、このようなベクターDNAは、作動可能に連結されたプロモーター (lacUV5プロモーター、trpプロモーター、trcプロモーター、tacプロモーター、lppプロモーター、lufBプロモーター、recAプロモーター、pLプロモーター等)、エンハンサー配列等の制御因子を有し
15 得る。例えば、pUCNT (W094/03613) 等が好適に用いられ得る。このプラスミドpUCNTは、lacプロモーターの下流に、NdeI、EcoRI部位等の挿入部位を有しているので、好適に用いられ得る。

20

(CRD酵素遺伝子およびこの酵素が依存する補酵素を再生する能力を有する酵素の遺伝子の両者を同時に含む組換えプラスミドの作製)

補酵素を再生する能力を有する酵素としては、例えば、ヒドロゲナーゼ、ギ酸脱水素酵素、アルコール脱水素酵素、アルデヒド脱水素酵素、グルコース-6-リン酸脱水素酵素およびグルコース脱水素酵素などを用いることが出来る。好適には、グルコース脱水素酵素が用いられる。さらに好適には、バシラス・メガテリ
25

ウム (*Bacillus megaterium*) 由来のグルコース脱水素酵素 (以下、GDHと略す) が用いられる。

5 プラスミドpGDA2(J. Biol. Chem., (1989), 264, 6381)は、*Bacillus megaterium* 由来のGDH遺伝子を含んでいる。このプラスミドからGDH遺伝子断片を切り出し、CRD酵素遺伝子を含むプラスミドのCRD酵素遺伝子の上流または下流に挿入することにより、CRD酵素遺伝子とGDH遺伝子の両者の遺伝子を有する組換えプラスミドが作製され得る。

(形質転換)

10 得られたCRD酵素遺伝子を有する組換えプラスミド、あるいはCRD酵素遺伝子とGDH遺伝子の両者の遺伝子を有する組換えプラスミドは、常法により宿主細胞に導入され得る。また、CRD酵素遺伝子を有する組換えプラスミドとGDH遺伝子を有する組換えプラスミドは、同時にあるいは別々に宿主細胞に導入され得、これら2つのプラスミドにより形質転換された形質転換株も得られ得る。

15 宿主細胞としては、細菌、酵母、糸状菌、植物細胞、動物細胞などが使用され得る。大腸菌の使用が特に好ましい。

20 宿主へのプラスミドの導入は、当業者に周知の方法、例えば、コンピテント (competent) 状態にされた宿主細胞と組換えプラスミドとを混合する工程を包含する方法、ヘルパー・プラスミドを用いて接合伝達により移入する工程を包含する方法などが挙げられる。

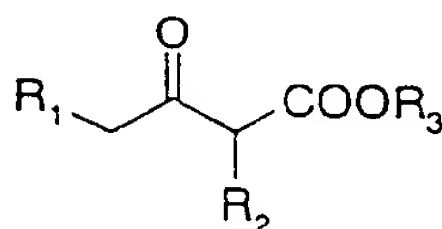
 宿主に導入されたされたプラスミドは、エピゾームとして自律的に複製し得るか、あるいはその全部または一部が染色体に組み込まれて染色体とともに複製し得る。

25 形質転換細胞中のGDH活性は、1Mトリス塩酸緩衝液 (pH8.0) に、基質グルコース0.1M、補酵素NADP2mM及び酵素を添加し、25℃で波長340nmの吸光度の増加を測定することにより行い得る。

(光学活性アルコールの取得)

光学活性アルコールの一種である光学活性4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルは、例えば以下のようにして取得される。

5 基質としては、以下の一般式：



(式中、R1はハロゲンであり、R2は水素であり、そしてR3は置換または非置換のアルキル基またはアリール基を表す) で表される4-ハロアセト酢酸エステルが用
10 いられ得る。R3がアルキル基である場合、R3は例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、およびイソプロピル基などである。R3がアリール基である場合、R3は例えば、フェニル基またはトリル基等である。これらのR3が置換されたアリール基である場合、R3は例えば、フルオロフェニル基、クロロフェニル基などである。

15 好適にはR1が塩素または臭素であり、R3が炭素数1～4のアルキル基である。より好適には、前記基質が、4-クロロアセト酢酸メチル、4-クロロアセト酢酸エチル、4-ブロモアセト酢酸メチル、または4-ブロモアセト酢酸エチルである。また、前記基質として、4-ヨードアセト酢酸エチル、4-ヒドロキシアセト酢酸エチル、2-クロロ-3-オキソ酪酸エチル、2-メチル-3-オキソ酪酸エチル、4-
20 アジドアセト酢酸エチルなども用いることができる。

この4-ハロアセト酢酸エステルは、例えば、特開昭61-146191に記載の方法により調製され得る。例えば4-ハロアセト酢酸エステルは、ジケテンを出発原料として、これにハロゲンを反応させ、4-ハロ-アセト酢酸ハライドとした後、これ

にアルコールを作用させる方法、あるいは、アセト酢酸エステルを出発原料として、アセト酢酸エステルの4位を直接ハロゲン化する方法などにより調製される。

反応は、適当な溶媒中に基質4-ハロアセト酢酸エステル、補酵素NADPH、および該形質転換微生物の培養物またはその処理物等を添加し、pH調整下撹拌することにより行い得る。反応は温度10℃～70℃、pH4～10で行う。また、基質の仕込み濃度は0.1%～90% (w/v)であるが、基質を連続的に添加し得る。反応はバッチ方式または連続方式で行い得る。

ここで、微生物の処理物等とは、例えば、粗抽出液、培養菌体、凍結乾燥生物体、アセトン乾燥生物体、またはそれらの菌体の磨砕物等を意味する。更にそれらは、酵素自体あるいは菌体のまま公知の手段で固定化されて用いられ得る。固定化は、当業者に周知の方法（例えば、架橋法、物理的吸着法、包括法など）で行い得る。

反応は、一般的に用いられるNADPH再生系を組み合わせることで用いることにより、高価な補酵素の使用量を大幅に減少させ得る。代表的なNADPH再生系としては、例えば、GDHおよびグルコースを用いる方法が挙げられる。反応条件は用いる酵素、微生物またはその処理物、基質濃度などによって異なるが、基質濃度約0.1～90重量%、反応温度10～50℃、pH5～8、反応時間、1～36時間である。

CRD酵素遺伝子およびこの酵素が依存する補酵素を再生する能力を有する酵素（例えば、GDH）の遺伝子を同一宿主微生物内に導入した形質転換微生物の培養物またはその処理物等を用いて同様の反応を行えば、別途に補酵素の再生に必要な酵素源を調製する必要がないため、より低コストで(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酢酸エステルが製造され得る。

反応で生じた4-ハロ-3-ヒドロキシ酢酸エステルは、常法により精製され得る。例えば、4-ハロ-3-ヒドロキシ酢酸エステルは、微生物を用いた場合などには必要に応じ遠心分離、濾過などの処理を施して菌体等の懸濁物を除去し、次いで酢酸エチル、トルエン等の有機溶媒で抽出し、硫酸ナトリウム等の脱水剤で脱水し、

有機溶媒を減圧下で除去し、そして減圧蒸留またはクロマトグラフィー等（例えば、シリカゲルカラムクロマトグラフィー）の処理を行うことにより、精製され得る。

4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルはガスクロマトグラフィーで定量され得る。
5 例えば、4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチルの定量は、PEG-20M Chromosorb WAW DMCS 10% 80/100mesh（ジーエルサイエンス株式会社製）を充填したガラスカラム（ID3mm×1m）を用い、150℃でクロマトグラフィーを行い、FIDにより検出することにより行い得る。

(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エチルの光学純度の測定は、光学分離カラムCHI
10 RALCEL OB（ダイセル化学工業株式会社製）を用いたHPLCにより行い得る。

以上のように、本願発明に従って、CRD酵素の大量生産が可能である。さらに、この酵素を利用することにより、(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルをはじめとする光学活性アルコールの優れた製造法が提供される。

以下、実施例により本願発明を詳細に説明する。しかし、本願発明はこれらの
15 実施例に限定されるものではない。

以下の実施例において用いた組換えDNA技術に関する詳細な操作方法などは、次のテキストに記載されている。

(I)Molecular Cloning 2nd Edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989))

20 (II)Current Protocols in Molecular Biology (Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience)

（実施例1：CRD酵素の精製）

以下の方法に従って、キャンディダ・マグノリエ (*Candida magnoliae*) IFO 0
25 705より4-ハロアセト酪酸エステルを不斉的に還元して(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルを生成する活性を有するCRD酵素を電気泳動的に単一に精製した。

下記の組成からなる液体培地8000mlを調製し、2000ml容坂口フラスコに400ml
ずつ分注して、120度で20分間蒸気殺菌をおこなった。

培地組成：

5	グルコース	5 %
	ポリペプトン	0.5 %
	KH ₂ PO ₄	0.2 %
	K ₂ HPO ₄	0.1 %
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.02 %
10	水道水	
	pH	6.5

これらの培地に、予め同培地中で前培養しておいたキャンディダ・マグノリエ
(*Candida magnoliac*) IF00705の培養液を5mlずつ接種し、30℃で3日間振とう培養
15 した。この培養液から遠心分離により菌体を集め、生理食塩水にて2回洗浄を行
った。このようにして、該菌株の湿菌体230gを得た。この湿菌体180gを360mlの5
0mMリン酸緩衝液 (pH7.0) に懸濁し、次いで菌体をダイノミル (Dyno-Mill社
製) で破碎した。この菌体破碎物から遠心分離にて菌体残渣を除き、無細胞抽出
液760mlを得た。この無細胞抽出液に40%飽和となるように硫酸アンモニウムを
20 添加し、これを溶解させ、次いで生じた沈殿を遠心分離により除去した後、上清
を0.1mMのDTTを含む10mMリン酸緩衝液 (pH7.0) に対して透析した。これを同
一緩衝液で予め平衡化したDEAE sephacel (Pharmacia Biotech製) カラム (500m
l) に供し、同一緩衝液でカラムを洗浄した。素通りしてきた溶出液から活性画分
を回収し、これに終濃度4MとなるようにNaClを添加した。この活性画分を4MのN
25 aClと0.1mMのDTTを含む10mMリン酸緩衝液 (pH7.0) で平衡化したPhenyl sepha
rose CL-4B (Pharmacia Biotech製) カラム (200ml) に供して、酵素を吸着させた。

同一緩衝液でカラムを洗浄した後、10mMリン酸緩衝液（pH7.0）を用い、NaCl（4Mから0Mまで）およびエチレングリコール（0%から50%（w/v）まで）のリニアグラジエントにより、活性画分を溶出させた。活性画分のうち最初に溶出されてくるものを集め、これを10mMリン酸緩衝液（pH7.0）に対して1夜透析を行った。

- 5 この透析液を0.1mM DTTを含む10mMリン酸緩衝液（pH7.0）で予め平衡化したMono Q HR 5/5（Pharmacia Biotech製FPLCシステム）カラム（1ml）に供し、同一緩衝液で洗浄を行った。洗浄液中の活性画分を集め、これを限外ろ過にて200 μ lに濃縮し、次いで0.2M塩化ナトリウム、0.1mM DTTを含む10mMリン酸緩衝液（pH7.0）にて予め平衡化したSuperdex 200 HR10/30（Pharmacia Biotech製）カラム（24
- 10 ml）に供し、同緩衝液で溶出した。活性画分を集め精製酵素標品を得た。

（実施例2：酵素の性質の測定）

実施例1において得られた酵素の酵素学的性質について検討した。

- 酵素活性の測定は、基本的には、200mMリン酸緩衝液（pH7.0）中に、基質4-クロロアセト酢酸エチル0.2mM、補酵素NADPH 0.32mM、および酵素溶液0.1mlを含む
- 15 3.0mlの反応液を、30℃、1分間反応させ、波長340nmの吸光度の減少を測定することにより行った。

（1）作用：NADPHを補酵素として、4-クロロアセト酢酸エチルに作用し、光学純度99% e.e. 以上の(S)-4-ヒドロキシ酪酸エチルを生成した。

- 20 （2）基質特異性：表1に示す各種カルボニル化合物を基質として、4-クロロアセト酢酸エチルと同様の条件で反応を行った結果、本願発明の酵素は表1に示す様な基質特異性を示した。

表 1

基質 0.2 mM	相対活性 (%)
4-クロロアセト酢酸エチル	100
アセト酢酸エチル	0
p-ニトロベンズアルデヒド	0
o-ニトロベンズアルデヒド	0
m-ニトロベンズアルデヒド	0
p-クロロベンズアルデヒド	0
o-クロロベンズアルデヒド	0
m-クロロベンズアルデヒド	0
ニコチンアルデヒド	0
イソニコチンアルデヒド	0
ベンズアルデヒド	0
グリオキサール	0
メチルグリオキサール	0
ジアセチル	19
クロロアセトアルデヒド	0
カンファーキノン	0
2-クロロアセト酢酸エチル	95
4-クロロアセト酢酸メチル	11
2-クロロアセト酢酸メチル	11
4-クロロアセト酢酸オクチル	36

(3) 至適pH：緩衝液としてリン酸緩衝液またはトリス-塩酸緩衝液を用いてpH 5.0～8.5の範囲で、上記方法で酵素活性を測定した。その結果、(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチルに作用する至適pHは5.5～6.5であった。

5 (4) 作用至適温度：20℃～60℃の温度で1分間の、4-クロロアセト酢酸エチルを基質とした場合の本願発明の酵素の活性を測定して、至適温度を求めた。その結果、至適温度は50℃～55℃であった。

(5) 熱安定性：本酵素をpH7.0において40℃で30分間処理した後、4-クロロアセト酢酸エチルを基質として活性を測定した結果、処理前の90%の活性が残存していた。

10 (6) 阻害剤：上記反応溶液に、表2に示す濃度の各種金属イオンまたは阻害剤を添加して、4-クロロアセト酢酸エチルを基質として(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチル活性を測定した。表2に示す様に、本願発明の酵素はクエルセチン、水銀イオンによって阻害を受けた。

表 2

化合物	添加濃度 (mM)	相対活性 (%)
無添加		100
クエルセチン (quercetin)	0.01	84
	0.1	0
ジフェニルヒダントイン	1	84
ジクマロール (dicoumarol)	0.1	97
2,4-ジニトロフェノール	0.1	86
DTNB	0.05	100
ヨード酢酸	1	100
NEM	1	105
PMSF	1	93
p-CMB	1	88
EDTA	1	95
フェニルヒドラジン	1	97
SnCl ₂	1	77
PbCl ₂	1	86
CdCl ₂	1	91
CuSO ₄	1	85
CoCl ₂	1	89
MgCl ₂	1	83
ZnSO ₄	1	97
HgCl ₂	0.1	49

(7) 分子量

酵素の分子量の測定はTSK-G3000SWカラムを用い、溶離液として0.1M Na_2SO_4 、0.05% NaN_3 を含む0.1Mリン酸緩衝液 (pH7.0) を用いた場合、約76,000であった。酵素のサブユニットの分子量は、2V/V%の2-メルカプトエタノール存在下、10% SDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、そして標準タンパクの相対移動度から算出することにより決定した。その結果、本酵素のサブユニットの分子量は約32,000であった。

(8) 有機溶媒耐性：本願発明の酵素が溶解しているpH7.0のリン酸緩衝液に等量の酢酸エチルまたは酢酸ブチルを添加し、28℃で30分間振とうした後遠心分離を行い、水相中の酵素の残存活性を、4-クロロアセト酢酸エチルを基質として測定した。その結果、酢酸エチルを添加した場合は72%、酢酸ブチルを添加した場合は85%の活性が残存していた。

(実施例3：本願発明の酵素を用いた(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチルの製造)

精製した本願発明の酵素50unit、4-クロロアセト酢酸エチル250mg、NADP 1.56 mg、グルコース280mg、グルコース脱水素酵素（天野製薬製）60unitを含む100mMリン酸緩衝液 (pH6.5) 25mlを、30℃で24時間攪拌した。反応終了後、反応液を酢酸エチルで抽出し、脱溶剤した後の抽出物の分析を行ったところ、収率98%で光学純度99% e. e. 以上の(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチルが生成していた。

(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチルの光学純度の測定は、上記記載のように光学分離カラムCHIRALCEL 0B（ダイセル化学工業製）を用いたHPLCにより行った。移動相としてヘキサン/イソプロパノール=9/1の混合溶媒を用い、移動相の流速は0.8ml/分でクロマトグラフィーを行った。検出は、215nmの吸光度を測定することにより行った。

(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチルの定量はガスクロマトグラフィーによ

り行った。PEG-20M Chromosorb WAW DMCS 10% 80/100mesh (ジーエルサイエンス株式会社製) を充填したガラスカラム (ID 3mm×1m) を用い、150℃でクロマトグラフィーを行い、検出はFIDにより行った。

5 (実施例4：本願発明の酵素を用いた(S)-4-ブromo-3-ヒドロキシ酪酸エチルの製造)

精製した本願発明の酵素 5 unit、4-ブromoアセト酪酸エチル 25mg、NADP 0.16mg、グルコース 28mg、グルコース脱水素酵素 (天野製薬製) 6 unit を含む 100mM リン酸緩衝液 (pH6.5) 2.5ml を、30℃で24時間攪拌した。反応終了後、反応液を酪酸エチルで抽出し、脱溶剤した後、抽出物の分析を行ったところ、収率43%で (S)-4-ブromo-3-ヒドロキシ酪酸エチルが生成していた。4-ブromo-3-ヒドロキシ酪酸エチルの定量は実施例2の4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチルの場合と同様に行った。

15 (実施例5：本願発明の酵素を用いた(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸メチルの製造)

精製した本願発明の酵素 5 unit、4-クロロアセト酪酸メチル 25mg、NADP 0.16mg、グルコース 28mg、グルコース脱水素酵素 (天野製薬製) 6 unit を含む 100mM リン酸緩衝液 (pH6.5) 2.5ml に酪酸ブチル 2.5ml を添加し、30℃で24時間攪拌した。反応終了後、反応液を酪酸エチルで抽出し、脱溶剤した後抽出物の分析を行ったところ、収率58%で (S)-4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸メチルが生成していた。4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸メチルの定量は実施例2の4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチルの場合と同様に行った。

25 (実施例6：本願発明の酵素を用いた(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチルの製造；基質の連続添加)

精製した本願発明の酵素100unit、NADP 1.56mg、グルコース4.5g、グルコース脱水素酵素（天野製薬製）250unit、NaCl 0.24gを含む100mMリン酸緩衝液（pH6.5）50mlに4-クロロアセト酢酸エチル3.8gを1時間に0.23gの速度で連続的に添加し、水酸化ナトリウムを用いてpHを調整しながら30℃で20時間攪拌した。反応終了後、反応液を酢酸エチルで抽出し、脱溶剤した後抽出物の分析を行ったところ、
5 収率91%で100%e.e.の(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチルが生成していた。4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチルの定量および光学純度の測定は実施例2と同様に行った。

10 (実施例7：CRD酵素遺伝子のクローニング)
(染色体DNAライブラリーの作製)

キャンディダ・マグノリエ (*Candida magnoliac*) IF0 0705の培養菌体から、H
ereford (Cell, 18, 1261 (1979)) に記載の方法に従って染色体DNAを抽出した。
得られた染色体DNAをSau3AIで部分消化し、この消化物のうち23kbから20kbの大
15 きさのDNA断片をEMBL3ファージベクター (Stratagene社製) のBamHI部位に挿入
した。得られた組換えファージベクターを、Gigapack II Gold (Stratagene社
製) を用いてインビトロパッケージングした後、これを大腸菌NM415に感染させ
て、約2万個からなる染色体DNAライブラリーを作製した。

20 (合成オリゴヌクレオチドプローブの作製)

実施例1のようにして得られた精製CRD酵素を8M尿素存在下で変性させた後、
アクロモバクター由来のリシルエンドペプチダーゼ (和光純薬工業株式会社製)
で消化し、得られたペプチド断片のアミノ酸配列をエドマン法により決定した。

このアミノ酸配列をもとに、以下の配列を有するDNAプローブを合成した。

プローブ1 : 5'-GCNCAYACNAARAAYGA-3' (配列番号 : 3)

プローブ2 : 5'-AAYGTNGARTAYCCNGC-3' (配列番号 : 4)

プローブ3 : 5'-CTRGTYCTRCTRCTTT-3' (配列番号 : 5)

- 5 プローブ1、2および3を、Megalabel (宝酒造株式会社製) を用いて³²Pで標識して、以下の実験に用いた。

(染色体DNAライブラリーからのCRD酵素遺伝子のクローニング)

- 10 作製した染色体DNAライブラリーを、³²P標識した合成DNAプローブを用いて、
 プラーク・ハイブリダイゼーション法 (Science, 196, 180 (1977)) により、C
 RD酵素遺伝子を含むファージのプラークについてスクリーニングを行った。そ
 の結果、1個のポジティブプラークが得られた。次に、このポジティブプラーク
 から得た組換えファージDNAをEcoRIおよびHindIIIで二重消化し、得られたDNAを
 サザン法 (J. Mol. Biol., 98, 53 (1975)) により解析した。その結果、EcoRI
15 およびHindIIIによる二重消化で生じる約1.3kbの消化断片が上記の合成DNAプロ
 ープとハイブリダイズした。そこで、この約1.3kbのDNA断片をプラスミドpUC19
 (宝酒造株式会社製) のEcoRI-HindIII部位に挿入した組換えプラスミドpUC-HE
 を構築し、CRD酵素遺伝子を含む染色体DNAクローンとして選択した。このプ
 ラスミドをpUC-HEと命名した。

20

(塩基配列の決定)

- この組換えプラスミドpUC-HEに種々の制限酵素を作用させ、その際に生じる消
 化断片の解析を行い、制限酵素切断地図を作成した。次に、この解析の際に得ら
 れた各種DNA断片をpUC19のマルチクローニングサイトに挿入した組換えプラスミ
25 ドを構築した。これらの組換えプラスミドを用いて、各々の挿入断片についての
 塩基配列分析を、ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction

Kit (Perkin Elmer社製) およびABI 373A DNA Sequencer (Applied Biosystems社製) を用いて行った。その結果、CRD酵素遺伝子が含まれると予想される約1.3kbのDNA断片の全塩基配列を決定した。その塩基配列を図1に示す。また、この塩基配列中の構造遺伝子部分については、その塩基配列から推定されるアミノ酸配列を図1中で塩基配列の下段に示す。このアミノ酸配列を、精製CRD酵素のリジルエンドペプチダーゼ消化ペプチド断片の部分アミノ酸配列と比較した結果、精製CRD酵素の部分アミノ酸配列は、塩基配列から推定されるアミノ酸配列中に存在し、N末端のメチオニンが欠失していることを除くとその部分で完全に一致することが見出された(図1中のアミノ酸配列の下線部分)。N末端のメチオニンはタンパク合成後の修飾により除去されるものと考えられる。

(実施例8: CRD酵素遺伝子を含む組換えプラスミドの作製)

大腸菌においてCRD酵素を発現させるために、形質転換に用いる組換えプラスミドを作製した。まず、CRD酵素の構造遺伝子の開始コドン部分にNdeI部位を付加し、かつ終止コドンの直後にEcoRI部位を付加した二本鎖DNAを以下の方法により取得した。実施例7で決定された塩基配列に基づき、CRD酵素の構造遺伝子の開始コドン部分にNdeI部位を付加したN末端DNAプライマーと、CRD酵素の構造遺伝子の終始コドンの直後にEcoRI部位を付加したC末端DNAプライマーとを合成した。これら2つのプライマーの塩基配列を以下に示す。

N末端側のDNAプライマー

5'-TAGTCGTTAACCATATGGCTAAGAACTTCTCCAAC-3' (配列番号: 6)

C末端側のDNAプライマー

5'-TCTGAGTTAACGAATTCTTAGGGAAGCGTAGCCACCGT-3' (配列番号: 7)

これら2つの合成DNAプライマーを用い、実施例7で得たプラスミドpUC-HEを鋳型としてPCRにより二本鎖DNAを合成した。得られたDNA断片をNdeIおよびEcoRIで消化し、プラスミドpUCNT (W094/03613) のlacプロモーターの下流のNdeI、EcoRI部位に挿入することにより、組換えプラスミドpNTS1を得た。

5

(実施例9：CRD酵素遺伝子およびGDH遺伝子の両者を同時に含む組換えプラスミドの作製)

プラスミドpGDA2(J. Biol. Chem., (1989), 264, 6381)をEcoRIおよびPstIで二重消化し、*Bacillus megaterium*由来のGDH遺伝子を含む約0.9kbのDNA断片を単離した。このDNA断片をプラスミドpSL301 (Invitrogen社製) のEcoRI-PstI部位に挿入した組換えプラスミドpSLGを構築した。さらに、pSLGをEcoRIおよびXhoIで二重消化し、*Bacillus megaterium*由来のGDH遺伝子を含む約0.9kbのDNA断片を単離した。このDNA断片を実施例8において構築したpNTS1のEcoRI-SalI部位(CRD遺伝子の下流に存在する)に挿入した組換えプラスミドpNTSIGを得た。

pNTSIGの作製法および構造を図2に示す。

10
15

(実施例10：組換え大腸菌の作製)

実施例8で得た組換えプラスミドpNTS1および実施例9で得た組換えプラスミドpNTSIGを用いて大腸菌HB101 (宝酒造株式会社製) を形質転換し、各々から組換え大腸菌HB101 (pNTS1) およびHB101 (pNTSIG) を得た。こうして得られた形質転換体である大腸菌HB101 (pNTS1) およびHB101 (pNTSIG) は、それぞれ、受託番号FERM BP-5834およびFERM BP-5835として、平成9年(1997年) 2月24日付けで、日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号(郵便番号305) 通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている。

20
25

また、実施例9と同様にプラスミドpGDA2(J. Biol. Chem., (1989), 264, 6381) をEcoRIおよびPstIで二重消化して得られる、*Bacillus megaterium*由来のGDH

遺伝子を含む約0.9kbのDNA断片を、プラスミドpSTV28（宝酒造株式会社製）のEcoRI-PstII部位に挿入して、組換えプラスミドpSTVGを構築した。このpSTVGで、予め塩化カルシウム法でコンピテント化しておいた大腸菌HB101 (pNTS1) を形質転換し、大腸菌HB101 (pNTS1, pSTVG) を得た。

5

（実施例 1 1：組換え大腸菌におけるCRD酵素の発現）

（組換え大腸菌のCRD酵素活性の測定）

実施例 1 0 で得た組換え大腸菌HB101 (pNTS1) を50 μ g/ml のアンピシリンを含む2×YT培地で培養し、集菌後、100mMリン酸緩衝液（pH6.5）に懸濁し、超音波破
10 碎により無細胞抽出液を得た。この無細胞抽出液のCRD酵素活性を以下のように測定した。CRD酵素活性の測定は、100mMリン酸緩衝液（pH6.5）に、基質4-クロロアセト酢酸エチル1mM、補酵素NADPH0.1mMおよび酵素を添加し、30℃で波長340nmの吸光度の減少を測定することにより行った。この反応条件において、1分間に1 μ mol のNADPHをNADPに酸化する酵素活性を1unitと定義した。この様に測
15 定した無細胞抽出液中のCRD酵素活性を比活性として表し、ベクタープラスミドのみの形質転換体と比較した。また、実施例 1 と同様の方法で調製したキャンディダ・マグノリエ（*Candida magnoliae*）IFO 0705の無細胞抽出液中のCRD酵素活性についても同様に比較した。それらの結果を表3に示す。大腸菌HB101 (pNTS1) では、ベクタープラスミドのみの形質転換体である大腸菌HB101 (pUCNT)
20 と比較して明らかなCRD酵素活性の増加が見られ、キャンディダ・マグノリエ（*Candida magnoliae*）IFO 0705と比較して約8.5倍の活性が得られた。

表 3

菌株名	C R D比活性 (U/mg)
HB101 (pUCNT)	<0.01
HB101 (pNTS1)	16.0
Candida magnoliae IFO 0705	1.89

(N末端配列の比較)

上記の発現実験と同様にして得られた無細胞抽出液、およびキャンディダ・マ
 5 グノリエ (*Candida magnoliae*) IFO 0705の無細胞抽出液から精製したC R D酵
 素のN末端アミノ酸配列をエドマン法によりそれぞれ30残基まで決定した。両者
 を比較した結果、両タンパクのN末端配列はこの範囲で完全に一致した。

(実施例12：組換え大腸菌におけるC R D酵素およびG D Hの同時発現)

10 実施例10で得た組換え大腸菌HB101 (pNTS1G) および大腸菌HB101 (pNTS1, pSTV
 G)を、実施例11と同様に処理して得られる無細胞抽出液のG D H活性を、以下
 のように測定した。G D H活性の測定は1Mトリス塩酸緩衝液 (pH8.0) に、基質
 グルコース0.1M、補酵素NADP2mM及び酵素を添加し、25℃で波長340nmの吸光度の
 増加を測定することにより行った。この反応条件において、1分間に1 μ molのNAD
 15 PをNADPHに還元する酵素活性を1unitと定義した。また、C R D酵素活性につい
 ても実施例10と同様に測定した。このように測定した無細胞抽出液中のC R D
 酵素およびG D H酵素活性を比活性として表し、大腸菌HB101 (pNTS1)、HB101 (pN
 T S1, pSTVG) およびベクターのみの形質転換体HB101 (pUCNT)と比較した結果を表
 4に示す。大腸菌HB101 (pNTS1G) およびHB101 (pNTS1, pSTVG)では、ベクタープラ
 20 スミドのみの形質転換体である大腸菌HB101 (pUCNT)と比較して、明らかなC R D
 酵素およびG D H活性の増加が見られた。

表 4

菌株名	C R D 比活性 (U/mg)	G D H 比活性 (U/mg)
HB101 (pUCNT)	<0.01	<0.01
HB101 (pNTS1)	16.0	<0.01
HB101 (pNTS1G)	8.03	62.6
HB101 (pNTS1, pSTVG)	13.5	1.6

(実施例 13 : C R D 酵素遺伝子を導入した組換え大腸菌による4-ハロアセト酢酸エステルからの(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルの合成)

- 5 実施例 10 で得た組換え大腸菌 HB101 (pNTS1) を、500ml 容坂口フラスコ中で滅菌した 100ml の 2×YT 培地に接種し、37℃ で 13 時間振とう培養した。得られた培養液 50ml に G D H (天野製薬株式会社製) 1250U、グルコース 5.5g、NADP 1.6mg を添加し、5M の水酸化ナトリウム水溶液で pH 6.5 に調製しつつ 30℃ で攪拌しながら、4-クロロアセト酢酸エチルを 15 分間毎に 250mg ずつ添加した。このようにして、合計 5g の 4-クロロアセト酢酸エチルを添加し、5 時間反応を行った。反応終了後、反応液を酢酸エチルで抽出し、脱溶剤した後抽出物の分析を行ったところ、収率 90% で 100% e. e. の (S)-4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチルが生成していた。

- 15 4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチルの定量はガスクロマトグラフィーにより行った。PEG-20M Chromosorb WAW DMCS 10% 80/100mesh (ジーエルサイエンス株式会社製) を充填したガラスカラム (ID3mm×1m) を用い、150℃ でクロマトグラフィーを行い、検出は FID により行った。

- 20 (S)-4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチルの光学純度の測定は光学分離カラム CHIRALCEL OB (ダイセル化学工業株式会社製) を用いた HPLC により行った。移動相としてヘキサン/イソプロパノール=9/1 の混合溶媒を用い、移動相の流速は 0.8ml / 分でクロマトグラフィーを行った。検出は、215nm の吸光度を測定することにより行った。

(実施例 14 : CRD 酵素及び GDH を同時発現させた組換え大腸菌による 4-ハロアセト酢酸エステルからの (S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルの合成)

5 実施例 10 で得た組換え大腸菌 HB101 [pNTS1G] を、500ml 容坂口フラスコ中で滅菌した 100ml の 2×YT 培地に接種し、37℃ で 13 時間振とう培養した。得られた培養液 50ml にグルコース 5.5g、NADP 3.2mg を添加し、5M の水酸化ナトリウム水溶液で pH 6.5 に調整しつつ 30℃ で攪拌しながら 4-クロロアセト酢酸エチルを 15 分間毎に 250mg ずつ添加した。このようにして、合計 5g の 4-クロロアセト酢酸エチルを添加し、5 時間反応を行った。反応終了後、反応液を酢酸エチルで抽出し、脱溶剤した
10 後抽出物の分析を行ったところ、収率 92% で 100% e. e. の (S)-4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチルが生成していた。

4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチルの定量およびその光学純度の測定は、実施例 13 と同様に行った。

15 (実施例 15 : CRD 酵素および GDH を同時発現させた組換え大腸菌による 4-クロロアセト酢酸エチルからの (S)-4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチルの合成)

実施例 10 で得た組換え大腸菌 HB101 (pNTS1G) を、500ml 容坂口フラスコ中で滅菌した 100ml の 2×YT 培地に接種し、37℃ で 13 時間振とう培養した。得られた培養液 40ml に、グルコース 19.2g、NADP 2.5mg を添加し、5M の水酸化ナトリウム水溶液
20 で pH 6.5 に調整しつつ 30℃ で攪拌しながら、4-クロロアセト酢酸エチルを毎時約 2g の速度で合計 16.1g を連続して添加した。反応は合計 24 時間行った。反応後、反応液を酢酸エチルで抽出し、減圧下で溶媒を留去し、濃縮物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製して、15.6g の (S)-4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチルを得た。この (S)-4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチルの光学純
25 度を HPLC 法により分析したところ、100% e. e. であった。¹H-NMR (CDCl₃) δ (ppm) : 1.33 (3H, t), 2.65 (2H, d), 3.31 (1H, d), 3.60 (2H, d), 4.2 (3H, m) ; カラム :

ダイセル化学工業社製、Chiralcel OB(0.46×25cm)；カラム温度：0℃；溶離液：n-ヘキサン／2-プロパノール＝9／1；流速：0.8ml/分；検出：215nm；溶出時間：(S)体－19.2分、(R)体－17.0分。

- 5 (実施例16：CRD酵素およびGDHを同時発現させた組換え大腸菌による4-クロロアセト酢酸エチルからの(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチルの合成)

実施例10で得た組換え大腸菌HB101(pNTS1G)を、500ml容坂口フラスコ中で滅菌した100mlの2×YT培地に接種し、37℃で13時間振とう培養した。得られた培養液40mlに、グルコース9.6g、5Mの水酸化ナトリウム水溶液でpH6.5に調整しつつ30℃で攪拌しながら、4-クロロアセト酢酸エチルを毎時約2gの速度で合計8.1gを連続して添加した。反応は合計24時間行った。反応後、反応液を酢酸エチルで抽出し、脱溶媒した後、濃縮物を分析したところ、収率96%で、100%e.e.の(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチルが生成していた。

10

- 15 (実施例17：CRD酵素およびGDHを同時発現させた組換え大腸菌による4-ブロモアセト酢酸エチルからの(S)-4-ブロモ-3-ヒドロキシ酪酸エチルの合成)

実施例10で得た組換え大腸菌HB101(pNTS1G)を、500ml容坂口フラスコ中で滅菌した100mlの2×YT培地に接種し、37℃で13時間振とう培養した。得られた培養液50mlに、グルコース1.3g、NADP3.2mgを添加し、4-ブロモアセト酢酸エチル1gを添加して、5Mの水酸化ナトリウム水溶液でpH6.5に調整しつつ30℃で攪拌しながら18時間反応した。反応後、反応液を酢酸エチルで抽出し、減圧下で溶媒を留去し、濃縮物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製して、900mgの(S)-4-ブロモ-3-ヒドロキシ酪酸エチルを得た。この(S)-4-ブロモ-3-ヒドロキシ酪酸エチルの光学純度を以下のように分析したところ、100%e.e.であった。分析は、試料をピリジン存在下で、イソシアン酸フェニルによりカーバメートとし、このものの光学純度をHPLC法により測定することにより行った。

20

25

1H-NMR(CDC13) δ (ppm) : 1.38 (3H, t), 2.75 (2H, m), 3.28 (1H, br), 3.51 (2H, m), 4.18 (3H, q), 4.25 (1H, m); カラム: ダイセル化学工業社製、Chiralcel OJ (0.46 \times 25cm); カラム温度: 25 $^{\circ}$ C; 溶離液: n-ヘキサン/2-プロパノール=9/1; 流速: 0.8ml/分; 検出: 254nm; 溶出時間: (S) 体-24.2分、(R) 体-27.8分。

(実施例 18: CRD 酵素および GDH を同時発現させた組換え大腸菌による 4-ヨードアセト酢酸エチルからの (S)-4-ヨード-3-ヒドロキシ酪酸エチルの合成)

実施例 10 で得た組換え大腸菌 HB101 (pNTS1G) を、500ml 容坂口フラスコ中で滅菌した 100ml の 2 \times YT 培地に接種し、37 $^{\circ}$ C で 13 時間振とう培養した。得られた培養液 50ml に、グルコース 0.5g、NADP 3.2mg を添加し、4-ヨードアセト酢酸エチル 0.5g を添加して、5M の水酸化ナトリウム水溶液で pH 6.5 に調整しつつ 30 $^{\circ}$ C で攪拌しながら 72 時間反応した。反応後、反応液を酢酸エチルで抽出し、減圧下で溶媒を留去し、濃縮物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製して、900mg の (S)-4-ヨード-3-ヒドロキシ酪酸エチルを得た。この (S)-4-ヨード-3-ヒドロキシ酪酸エチルの光学純度を以下のように分析したところ、91.6% e.e. であった。分析は、試料をジメチルスルホキシド中でシアン化ナトリウムと加熱することにより 4-シアノ-3-ヒドロキシ酪酸エチルとし、これをピリジン存在下で、塩化ベンゾイルにより安息香酸エステルとし、このものの光学純度を HPLC 法により測定することにより行った。NMR(CDC13) δ (ppm) : 1.28 (3H, t), 2.65 (2H, d), 3.31 (3H, m), 4.00 (1H, m), 4.20 (2H, q); カラム: ダイセル化学工業社製、Chiralpak AS (0.46 \times 25cm); カラム温度: 25 $^{\circ}$ C; 溶離液: n-ヘキサン/エタノール=95/5; 流速: 1ml/分; 検出: 254nm; 溶出時間: (S) 体-19.6分、(R) 体-21.3分。

(実施例 19 : CRD 酵素および GDH を同時発現させた組換え大腸菌による 4-クロロアセト酢酸メチルからの (S)-4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸メチルの合成)

実施例 10 で得た組換え大腸菌 HB101 (pNTS1G) を、500ml 容坂口フラスコ中で滅菌した 100ml の 2×YT 培地に接種し、37℃ で 13 時間振とう培養した。得られた培養液 50ml に、グルコース 7.2g、NADP 3.2mg を添加し、4-クロロアセト酢酸メチル 4g を添加して、5M の水酸化ナトリウム水溶液で pH 6.5 に調整しつつ 30℃ で攪拌しながら 24 時間反応した。反応後、反応液を酢酸エチルで抽出し、減圧下で溶媒を留去し、濃縮物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製して、3.85g の (S)-4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸メチルを得た。この (S)-4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸メチルの光学純度を以下のように分析したところ、100% e. e. であった。分析は、試料をピリジン存在下で、イソシアン酸フェニルによりカーバメートとし、このものの光学純度を HPLC 法により測定することにより行った。
1H-NMR (CDCl₃) δ (ppm) : 2.65 (2H, m)、3.20 (1H, br)、3.63 (2H, m)、3.73 (3H, s)、4.28 (1H, m) ; カラム : ダイセル化学工業社製、Chiralcel OJ (0.46×25cm) ; カラム温度 : 25℃ ; 溶離液 : n-ヘキサン / 2-プロパノール = 8 / 2 ; 流速 : 1 ml / 分 ; 検出 : 254nm ; 溶出時間 : (S) 体 - 19.2 分、(R) 体 - 22.6 分。

(実施例 20 : CRD 酵素および GDH を同時発現させた組換え大腸菌による 4-アジドアセト酢酸エチルからの (S)-4-アジド-3-ヒドロキシ酪酸エチルの合成)

実施例 10 で得た組換え大腸菌 HB101 (pNTS1G) を、500ml 容坂口フラスコ中で滅菌した 100ml の 2×YT 培地に接種し、37℃ で 13 時間振とう培養した。得られた培養液 50ml に、グルコース 3.1g、NADP 3.2mg を添加し、4-アジドアセト酢酸エチル 2g を添加して、5M の水酸化ナトリウム水溶液で pH 6.5 に調整しつつ 30℃ で攪拌しながら 72 時間反応した。反応後、反応液を酢酸エチルで抽出し、減圧下で溶媒を留去し、濃縮物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製して、1.6g の (S)-4-アジド-3-ヒドロキシ酪酸エチルを得た。この (S)-4-アジド-3-ヒ

ドロキシ酪酸エチルの光学純度をHPLC法により分析したところ、90.0%e.e.であった。¹H-NMR(CDC13) δ (ppm) : 1.25(3H, t)、2.55(2H, d)、3.30-3.35(3H, m)、4.20(3H, m) ; カラム : ダイセル化学工業社製、Chiralcel OB(0.46×25cm) ; カラム温度 : 25℃ ; 溶離液 : n-ヘキサン/2-プロパノール=9/1 ; 流速 : 1 ml/分 ; 検出 : 254nm ; 溶出時間 : (S) 体-16.2分、(R) 体-19.6分。

(実施例 21 : CRD 酵素およびGDHを同時発現させた組換え大腸菌による4-ヒドロキシアセト酪酸エチルからの(S)-3,4-ジヒドロキシ酪酸エチルの合成)

実施例 10 で得た組換え大腸菌HB101(pNTS1G)を、500ml容坂口フラスコ中で滅菌した100mlの2×YT培地に接種し、37℃で13時間振とう培養した。得られた培養液50mlに、グルコース7.4g、NADP3.2mgを添加し、4-ヒドロキシアセト酪酸エチル4gを添加して、5Mの水酸化ナトリウム水溶液でpH6.5に調整しつつ30℃で攪拌しながら18時間反応した。反応後、反応液を酢酸エチルで抽出し、減圧下で溶媒を留去し、濃縮物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製して、3.2gの(S)-3,4-ジヒドロキシ酪酸エチルを得た。この(S)-3,4-ジヒドロキシ酪酸エチルの光学純度を以下のように分析したところ、100%e.c.であった。分析は、試料をエタノール中でシアン化ナトリウムと室温で反応させることにより4-シアノ-3-ヒドロキシ酪酸エチルとし、これをピリジン存在下で、塩化ベンゾイルにより安息香酸エステルとし、このものの光学純度をHPLC法により測定することにより行った。¹H-NMR(CDC13) δ (ppm) : 1.30(3H, t)、2.55(2H, m)、3.18(1H, br)、3.55(1H, d)、3.68(1H, d)、4.15(1H, s)、4.20(2H, q) ; カラム : ダイセル化学工業社製、Chiralpak AS(0.46×25cm) ; カラム温度 : 25℃ ; 溶離液 : n-ヘキサン/エタノール=95/5 ; 流速 : 1 ml/分 ; 検出 : 254nm ; 溶出時間 : (S) 体-19.6分、(R) 体-21.3分。

(実施例 22 : CRD 酵素および GDH を同時発現させた組換え大腸菌による 2-メチル-3-オキソ酢酸エチルの還元による 3-ヒドロキシ-2-メチル酪酸エチルの合成)

5 実施例 10 で得た組換え大腸菌 HB101 (pNTS1G) を、500ml 容坂口フラスコ中で滅菌した 100ml の 2×YT 培地に接種し、37℃ で 13 時間振とう培養した。得られた培養液 50ml に、グルコース 7.5g、NADP 3.2mg を添加し、2-メチル-3-オキソ酢酸エチル 4g を添加して、5M の水酸化ナトリウム水溶液で pH6.5 に調整しつつ 30℃ で攪拌しながら 18 時間反応した。反応後、反応液を酢酸エチルで抽出し、減圧下で溶媒を留去し、濃縮物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製して、3.10 5g の 3-ヒドロキシ-2-メチル酪酸エチルを得た。この 3-ヒドロキシ-2-メチル酪酸エチルの光学純度を以下のように分析したところ、91.6% e. e. であった。分析は、試料をジメチルスルホキシド中でシアン化ナトリウムと室温で反応させることにより 4-シアノ-3-ヒドロキシ酪酸エチルとし、これをピリジン存在下で、塩化ベンゾイルにより安息香酸エステルとし、このものの光学純度を HPLC 法により 15 測定することにより行った。1H-NMR (CDCl₃) δ (ppm) : 1.17 (3H, t)、1.22 (2H, t)、1.28 (3H, t)、2.46 (1H, m)、2.82 (1H, br)、3.90 (1H, m)、4.18 (2H, q)。

20 (実施例 23 : CRD 酵素および GDH を同時発現させた組換え大腸菌による 2-クロロ-3-オキソ酢酸エチルの還元による 2-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチルの合成)

25 実施例 10 で得た組換え大腸菌 HB101 (pNTS1G) を、500ml 容坂口フラスコ中で滅菌した 100ml の 2×YT 培地に接種し、37℃ で 13 時間振とう培養した。得られた培養液 50ml に、グルコース 6.5g、NADP 3.2mg を添加し、2-クロロ-3-オキソ酢酸エチル 4g を添加して、5M の水酸化ナトリウム水溶液で pH6.5 に調整しつつ 30℃ で攪拌しながら 18 時間反応した。反応後、反応液を酢酸エチルで抽出し、減圧下で溶媒を留去し、濃縮物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製して、3.

8gの2-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチルを得た。¹H-NMR(CDC13) δ (ppm) : 1.35 (6H, m)、2.55 (1H, br)、4.15 (1H, d)、4.25 (1H, m)、4.30 (2H, q)。

産業上の利用の可能性

- 5 新規なCRD酵素を用いて、医薬などの合成中間体として有用な(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルなどの光学活性アルコールを効率よく製造することが可能となった。

- 10 このCRD酵素遺伝子のクローニングおよびその塩基配列の解析により、高いCRD酵素産生能を有する形質転換体を得ることが可能になった。また、CRD酵素およびGDHを同時に高生産する能力を有する形質転換体をも得ることが可能になった。

これらの形質転換体を用いることにより、4-ハロアセト酢酸エステルなどのカルボニル化合物からの(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルなどの光学活性アルコールの合成を、さらに効率良く行うことが可能となった。

配列表

配列番号 1

配列の長さ : 283

配列の型 : アミノ酸

5 配列の種類 : ペプチド

トポロジー : 直鎖状

配列 :

	Met	Ala	Lys	Asn	Phe	Ser	Asn	Val	Glu	Tyr	Pro	Ala	Pro	Pro	Pro	Ala	
	1					5					10					15	
10	His	Thr	Lys	Asn	Glu	Ser	Leu	Gln	Val	Leu	Asp	Leu	Phe	Lys	Leu	Asn	
				20					25					30			
	Gly	Lys	Val	Ala	Ser	Ile	Thr	Gly	Ser	Ser	Ser	Gly	Ile	Gly	Tyr	Ala	
			35					40					45				
	Leu	Ala	Glu	Ala	Phe	Ala	Gln	Val	Gly	Ala	Asp	Val	Ala	Ile	Trp	Tyr	
15		50					55					60					
	Asn	Ser	His	Asp	Ala	Thr	Gly	Lys	Ala	Glu	Ala	Leu	Ala	Lys	Lys	Tyr	
	65				70					75					80		
	Gly	Val	Lys	Val	Lys	Ala	Tyr	Lys	Ala	Asn	Val	Ser	Ser	Ser	Asp	Ala	
				85						90					95		
20	Val	Lys	Gln	Thr	Ile	Glu	Gln	Gln	Ile	Lys	Asp	Phe	Gly	His	Leu	Asp	
				100						105					110		
	Ile	Val	Val	Ala	Asn	Ala	Gly	Ile	Pro	Trp	Thr	Lys	Gly	Ala	Tyr	Ile	
			115					120					125				
	Asp	Gln	Asp	Asp	Asp	Lys	His	Phe	Asp	Gln	Val	Val	Asp	Val	Asp	Leu	
25		130					135						140				
	Lys	Gly	Val	Gly	Tyr	Val	Ala	Lys	His	Ala	Gly	Arg	His	Phe	Arg	Glu	

145 150 155 160
 Arg Phe Glu Lys Glu Gly Lys Lys Gly Ala Leu Val Phe Thr Ala Ser
 165 170 175
 Met Ser Gly His Ile Val Asn Val Pro Gln Phe Gln Ala Thr Tyr Asn
 5 180 185 190
 Ala Ala Lys Ala Gly Val Arg His Phe Ala Lys Ser Leu Ala Val Glu
 195 200 205
 Phe Ala Pro Phe Ala Arg Val Asn Ser Val Ser Pro Gly Tyr Ile Asn
 210 215 220
 10 Thr Glu Ile Ser Asp Phe Val Pro Gln Glu Thr Gln Asn Lys Trp Trp
 225 230 235 240
 Ser Leu Val Pro Leu Gly Arg Gly Gly Glu Thr Ala Glu Leu Val Gly
 245 250 255
 Ala Tyr Leu Phe Leu Ala Ser Asp Ala Gly Ser Tyr Ala Thr Gly Thr
 15 260 265 270
 Asp Ile Ile Val Asp Gly Gly Tyr Thr Leu Pro
 275 280

配列番号 2

20 配列の長さ : 852

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ゲノムDNA

25 配列 :

ATGGCTAAGA ACTTCTCCAA CGTCGAGTAC CCCGCCCCGC CTCCGGCCCA CACCAAGAAC 60

GAGTCGCTGC AGGTCCTTGA CCTGTTCAAG CTGAATGGCA AGGTTGCCAG CATCACTGGC 120
TCGTCCAGCG GTATTGGCTA CGCTCTGGCT GAGGCCTTCG CGCAGGTCGG CGCTGACGTC 180
GCCATCTGGT ACAACAGCCA CGACGCTACT GGCAAGGCTG AGGCCCTCGC CAAGAAGTAC 240
GGCGTCAAGG TCAAGGCCTA CAAGGCCAAC GTGAGCAGCT CTGACGCCGT GAAGCAGACG 300
5 ATCGAGCAGC AGATCAAGGA CTTGGGCCAC CTCGACATTG TCGTGGCGAA CGCCGGCATT 360
CCCTGGACGA AGGGTGCCTA CATCGACCAG GACGACGACA AGCACTTCGA CCAGGTCGTT 420
GACGTCGATC TGAAGGGTGT TGGATACGTC GCGAAGCACG CTGGCCGTCA CTTCCGCGAG 480
CGCTTCGAGA AGGAGGGCAA GAAGGGCGCC CTTGTGTTCA CGGCCTCCAT GTCTGGCCAC 540
ATTGTGAACG TGCCCCAGTT CCAGGCCACG TACAACGCGG CCAAGGCTGG CGTGCGCCAC 600
10 TTCGCGAAGT CGCTGGCCGT CGAGTTCGCG CCGTTCGCGC GCGTGAATC TGTGTGCCCC 660
GGCTACATCA ACACGGAGAT CTCGGACTTC GTGCCCCAGG AGACGCAGAA CAAGTGGTGG 720
TCGCTCGTGC CCCTTGGCCG CGGCGGAGAG ACGGCCGAGC TCGTTGGCGC CTACCTGTTC 780
CTTGCATCTG ACGCCGGCTC GTACGCCACT GGTACGGACA TCATTGTTGA CGGTGGCTAC 840
ACGCTTCCCT AA 852

15

配列番号 3

配列の長さ : 17

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

20

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列 :

GCNCAYACNA ARAAYGA

17

25

配列番号 4

配列の長さ : 17

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

5

配列：

AAYGTNGART AYCCNGC

17

配列番号 5

配列の長さ：17

10

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列：

15

CTRGTYCTRC TRCTRTT

17

配列番号 6

配列の長さ：35

配列の型：核酸

20

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列：

TAGTCG1TAA CCATATGGCT AAGAACTTCT CCAAC

35

25

配列番号 7

配列の長さ：40

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

5 配列の種類：合成DNA

配列：

TCTGAGTTAA CGAATTCTTA GGGAAGCGTG TAGCCACCGT

40

請求の範囲

1. 以下の(1)から(4)の理化学的性質を有するカルボニル還元酵素:

(1) 作用:

5 NADPHを補酵素として、4-クロロアセト酢酸エチルに作用し、(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチルを生成する、

(2) 基質特異性:

4-クロロアセト酢酸エチルに対して強い活性を示し、アセト酢酸エチルには実質的に活性を示さない、

10 (3) 至適pH: pH5.5~6.5、および

(4) 作用至適温度: 50℃~55℃。

2. さらに、以下の(5)から(7)の理化学的性質を有する請求項1に記載のカルボニル還元酵素:

15 (5) 熱安定性: pH7.0で30分間処理したときに約40℃まで安定である、

(6) 阻害剤: 水銀イオン、クエルセチンにより阻害される、および

(7) 分子量: ゲル濾過分析において約76,000、SDSポリアクリルアミド電気泳動分析において約32,000。

20 3. 配列表の配列番号1のアミノ酸配列または配列表の配列番号1のアミノ酸配列において1または数個のアミノ酸が欠失、置換、または付加されたアミノ酸配列あるいはその一部を有し、かつ4-クロロアセト酢酸エチルを不斉的に還元して(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチルを生成する活性を有する、カルボニル還元酵素。

25

4. 前記酵素が、カンディダ(Candida)属に属する微生物から得られた酵素

である、請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載の酵素。

5. 前記酵素が、カンディダ・マグノリエ (*Candida magnoliae*) から得られた酵素である、請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載の酵素。

5

6. 前記酵素が、カンディダ・マグノリエ IF0 0705 から得られた酵素である、請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載の酵素。

7. 請求項 1 ～ 6 のいずれかに記載の酵素をコードする DNA。

10

8. 前記 DNA が配列表の配列番号 2 のヌクレオチド配列を有する、請求項 7 に記載の DNA。

9. 請求項 7 または 8 に記載の DNA を有するプラスミド。

15

10. 前記プラスミドが pNTS1 である、請求項 9 に記載のプラスミド。

11. 請求項 9 または 10 に記載のプラスミドにより形質転換された形質転換細胞。

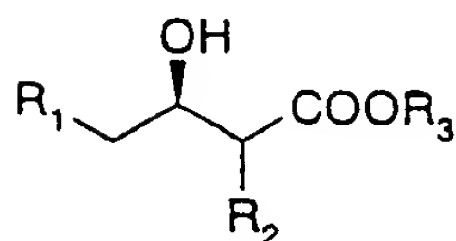
20

12. 前記形質転換細胞が大腸菌である、請求項 11 に記載の形質転換細胞。

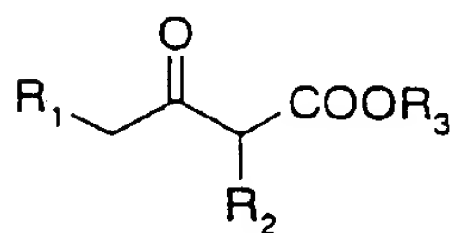
13. 前記形質転換細胞が *E. coli* HB101 (pNTS1) である、請求項 11 に記載の形質転換細胞。

25

14. 以下の一般式：



（式中、R1はハロゲン原子であり、R2は水素であり、R3は置換または非置換のアルキル基またはアリール基を表す）で表される(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステル
 5 ステルの製造方法であって、該方法は、以下の一般式：



（式中、R1はハロゲン原子であり、R2は水素であり、R3は置換または非置換のアルキル基またはアリール基を表す）で示される4-ハロアセト酢酸エステルと請求
 10 項1～3のいずれかに記載の酵素、あるいは該酵素の産生能を有する微生物の培養物あるいはその処理物とを反応させる工程を包含する、方法。

15 15．前記ハロゲン原子が塩素または臭素であり、前記R3が炭素数1～4のアルキル基である、請求項14に記載の方法。

16．前記基質が、4-クロロアセト酢酸メチル、4-クロロアセト酢酸エチル、4-ブロモアセト酢酸メチル、または4-ブロモアセト酢酸エチルである、請求
 20 項15に記載の方法。

17．前記微生物が、カンディダ（Candida）属に属する微生物である、請求
 20 項14～16のいずれかに記載の方法。

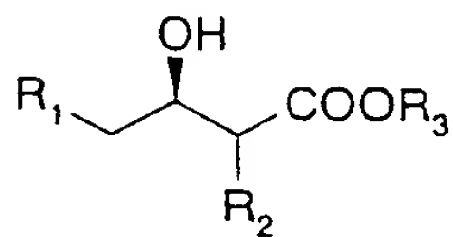
18. 前記微生物が、カンディダ・マグノリエ (*Candida magnoliae*) である、請求項17に記載の方法。

5 19. 前記微生物が、カンディダ・マグノリエ IF0 0705である、請求項18に記載の方法。

20. 前記微生物が、請求項11～13のいずれかに記載の形質転換細胞である、請求項14～16のいずれかに記載の方法。

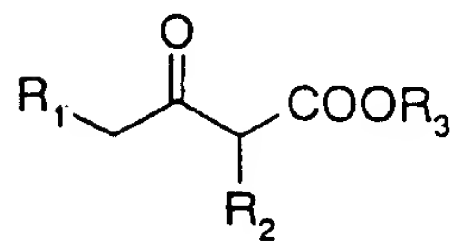
10

21. 以下の一般式：

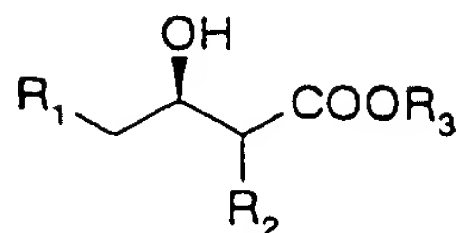


で表される光学活性3-ヒドロキシ-酪酸エステル類の製造方法であって、以下の一般式：

15

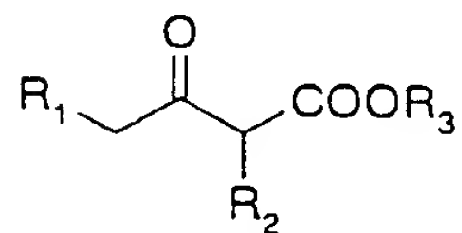


で表される3-オキソ-酪酸エステル類を不斉的に還元して、以下の一般式：

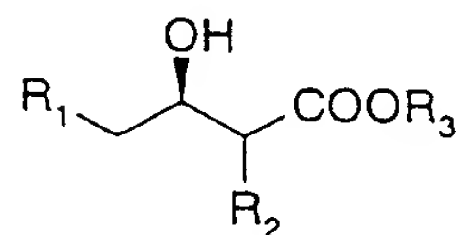


で表される光学活性3-ヒドロキシ-酪酸エステル類を生成する活性を有する酵素をコードするDNAを有するプラスミドで形質転換された形質転換細胞と、以下の一般式：

5



で表される3-オキソ-酪酸エステル類とを反応させる工程、および生成した以下の一般式：



10

で表される光学活性3-ヒドロキシ-酪酸エステル類を採取する工程を包含する方法。

15

22. 前記一般式において、R1およびR2がそれぞれ独立して、ハロゲン、アジド、ベンジルアミノまたは水素であり、ここでR1またはR2のいずれか一方が水素であり、そしてR3が置換または非置換のアルキル基またはアリール基である、または前記一般式において、R1およびR2がそれぞれ独立して、アルキル基、水酸基または水素であり、ここでR1またはR2のいずれか一方が水素であり、そしてR3が置換または非置換のアルキル基またはアリール基である、請求項21に記載の方法。

23. 前記一般式において、R1が水酸基であり、R2が水素であり、そしてR3がエチルである、請求項22に記載の方法。

5 24. 前記一般式において、R1が塩素であり、R2が水素であり、そしてR3がエチルである、請求項22に記載の方法。

25. 前記形質転換細胞が請求項11～13のいずれかに記載の形質転換細胞である、請求項21～24のいずれかに記載の方法。

10

26. 請求項7または8に記載のDNAおよびグルコース脱水素酵素をコードするDNAを有するプラスミド。

15

27. 前記グルコース脱水素酵素が、バシラス・メガテリウム (*Bacillus megaterium*) に由来する、請求項26に記載のプラスミド。

28. 前記プラスミドが pNTS1Gである、請求項27に記載のプラスミド。

20

29. 請求項26～28のいずれかに記載のプラスミドにより形質転換された形質転換細胞。

30. 前記形質転換細胞が大腸菌である、請求項29に記載の形質転換細胞。

25

31. 前記形質転換細胞がE. coli HB101 (pNTS1G)である、請求項30に記載の形質転換細胞。

3 2. 光学活性アルコールの製造方法であって、カルボニル化合物を不斉的に還元して光学活性アルコールを生成する活性を有する酵素をコードするDNAおよび該酵素が依存する補酵素を再生する能力を有する酵素をコードするDNAを有するプラスミドで形質転換された形質転換細胞と、カルボニル化合物とを反応させる工程、ならびに生成した光学活性アルコールを採取する工程を包含する、方法。

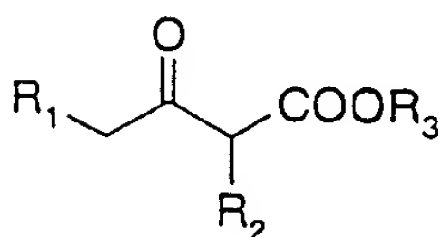
10

3 3. 前記補酵素を再生する能力を有する酵素がグルコース脱水素酵素である、請求項 3 2 に記載の方法。

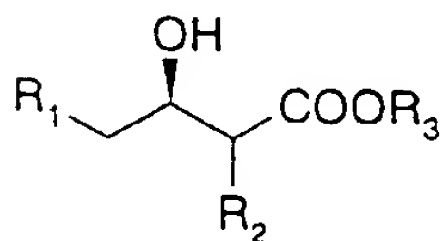
3 4. 前記形質転換細胞が請求項 2 9 ~ 3 1 のいずれかに記載の形質転換細胞である、請求項 3 2 に記載の方法。

15

3 5. 前記カルボニル化合物が以下の一般式：



で表される3-オキソ-酪酸エステル類であり、得られる光学活性アルコールが以下の一般式：



20

で表される光学活性3-ヒドロキシ-酪酸エステル類である、請求項 3 2 ~ 3 4 の

いずれかに記載の方法。

36. 前記一般式において、R1およびR2がそれぞれ独立して、ハロゲン、アジド、
ベンジルアミノまたは水素であり、ここでR1またはR2のいずれか一方が水素であ
5 り、そしてR3が置換または非置換のアルキル基またはアリール基である、または
前記一般式において、R1およびR2がそれぞれ独立して、アルキル基、水酸基また
は水素であり、ここでR1またはR2のいずれか一方が水素であり、そしてR3が置換
または非置換のアルキル基またはアリール基である、請求項35に記載の方法。

10 37. 前記一般式において、R1が塩素であり、R2が水素であり、そしてR3がエチ
ルである、請求項36に記載の方法。

38. 請求項7または8に記載のDNAを有する第1のプラスミドおよびグルコ
ース脱水素酵素をコードするDNAを有する第2のプラスミドにより形質転換さ
15 れた形質転換細胞。

39. 前記第1のプラスミドがpNTS1であり、グルコース脱水素酵素がバシラ
ス・メガテリウム (*Bacillus megaterium*) に由来する、請求項38に記載の形
質転換細胞。

20

40. 前記形質転換細胞が大腸菌である、請求項38または39に記載の形質転
換細胞。

41. 光学活性アルコールの製造方法であって、カルボニル化合物を不斉的に還
25 元して光学活性アルコールを生成する活性を有する酵素をコードするDNAを有
する第一のプラスミドおよび該酵素が依存する補酵素を再生する能力を有する酵

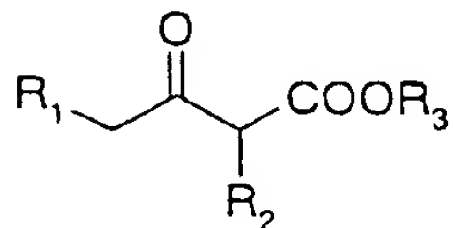
素をコードするDNAを有する第二のプラスミドで形質転換された形質転換細胞と、カルボニル化合物とを反応させる工程、ならびに生成した光学活性アルコールを採取する工程を包含する、方法。

5 42. 前記補酵素を再生する能力を有する酵素がグルコース脱水素酵素である、請求項41に記載の方法。

43. 前記形質転換細胞が請求項38～40のいずれかに記載の形質転換細胞である、請求項41に記載の方法。

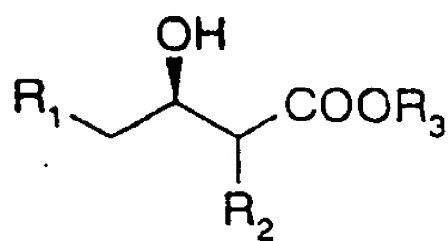
10

44. 前記カルボニル化合物が以下の一般式：



15

で表される3-オキソ-酪酸エステル類であり、得られる光学活性アルコールが以下の一般式：



で表される光学活性3-ヒドロキシ-酪酸エステル類である、請求項41～43のいずれかに記載の方法。

20

45. 前記一般式において、R1およびR2がそれぞれ独立して、ハロゲン、アジド、

ベンジルアミノまたは水素であり、ここでR1またはR2のいずれか一方が水素であり、そしてR3が置換または非置換のアルキル基またはアリール基である、または前記一般式において、R1およびR2がそれぞれ独立して、アルキル基、水酸基または水素であり、ここでR1またはR2のいずれか一方が水素であり、そしてR3が置換または非置換のアルキル基またはアリール基である、請求項44に記載の方法。

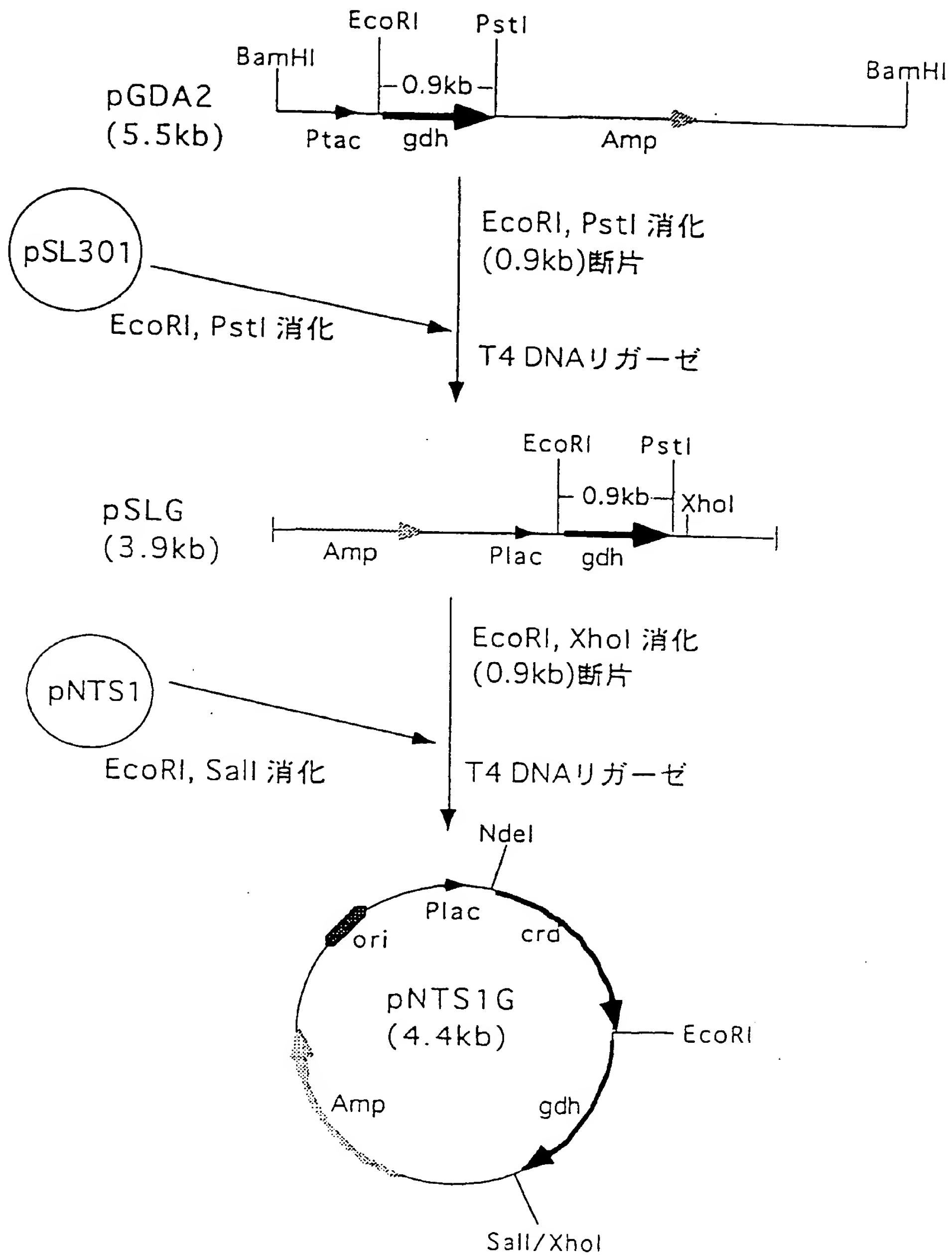
46. 前記一般式において、R1が塩素であり、R2が水素であり、そしてR3がエチルである、請求項45に記載の方法。

☒ 1

59
AAGCTTGGGGAACCGACGTCCCCGCCCTCGTACATGCAGTGCATACAGCATTGCCCAA
119
CCCCACATTGTGCCCCCACCACCCCGCGGATTCCGTAACTATATAAAGGCCGCCAGTGCC
179
GACTATGGACCATCATCCCGAAATCACCAAGAACTAACAATGGCTAAGAACTTCTCCAAC
MetAlaLysAsnPheSerAsn
239
GTCGAGTACCCCGCCCCGCCTCCGGCCCCACACCAAGAACGAGTCGCTGCAGGTCCTTGAC
ValGluTyrProAlaProProProAlaHisThrLysAsnGluSerLeuGlnValLeuAsp
299
CTGTTCAAGCTGAATGGCAAGGTTGCCAGCATCACTGGCTCGTCCAGCGGTATTGGCTAC
LeuPheLysLeuAsnGlyLysValAlaSerIleThrGlySerSerSerGlyIleGlyTyr
359
GCTCTGGCTGAGGCCTTCGCGCAGGTCGGCGCTGACGTCGCCATCTGGTACAACAGCCAC
AlaLeuAlaGluAlaPheAlaGlnValGlyAlaAspValAlaIleTrpTyrAsnSerHis
419
GACGCTACTGGCAAGGCTGAGGCCCTCGCCAAGAAGTACGGCGTCAAGGTCAAGGCCTAC
AspAlaThrGlyLysAlaGluAlaLeuAlaLysLysTyrGlyValLysValLysAlaTyr
479
AAGGCGAACGTGAGCAGCTCTGACGCCGTGAAGCAGACGATCGAGCAGCAGATCAAGGAC
LysAlaAsnValSerSerSerAspAlaValLysGlnThrIleGluGlnGlnIleLysAsp
539
TTCGGCCACCTCGACATTGTCGTGGCGAACGCCGGCATTCCTGGACGAAGGGTGCCTAC
PheGlyHisLeuAspIleValValAlaAsnAlaGlyIleProTrpThrLysGlyAlaTyr
599
ATCGACCAGGACGACGACAAGCACTTCGACCAGGTCGTTGACGTCGATCTGAAGGGTGTT
IleAspGlnAspAspAspLysHisPheAspGlnValValAspValAspLeuLysGlyVal
659
GGATACGTCGCGAAGCACGCTGGCCGTCACCTCCGCGAGCGCTTCGAGAAGGAGGGCAAG
GlyTyrValAlaLysHisAlaGlyArgHisPheArgGluArgPheGluLysGluGlyLys

1 / 2

図 2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/03051

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C12N9/02, C12N15/53, C12N15/63, C12N1/21, C12P7/62 //
(C12N9/02, C12R1:91), (C12P7/62, C12R1:91)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C12N9/02, C12N15/53, C12N15/63, C12N1/21, C12P7/62

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), GENETYX

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 61-146191, A (Kaneka Corp.), July 3, 1986 (03. 07. 86) (Family: none)	1 - 46
A	JP, 6-38776, A (Ajinomoto Co., Inc.), February 15, 1994 (15. 02. 94) & US, 5413921, A	1 - 46
A	JP, 6-209782, A (Daicel Chemical Industries, Ltd.), August 2, 1994 (02. 08. 94) & EP, 606899, A2 & US, 5559030, A & CA, 2113240, A	1 - 46
A	JP, 8-336393, A (Mitsubishi Chemical Corp.), December 24, 1996 (24. 12. 96) & EP, 737751, A2	1 - 46
A	JP, 63-304991, A (Kaneka Corp.), December 13, 1988 (13. 12. 88) (Family: none)	1 - 46

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

December 9, 1997 (09. 12. 97)

Date of mailing of the international search report

December 24, 1997 (24. 12. 97)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/03051

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Enzyme Microb. Technol. <u>15</u> (1993) J. Peters et al. "A novel NADH-dependent carbonyl reductase with an extremely broad substrate range from Candida parapsilosis: Purification and characterization" p. 950-958	1 - 46
A	Enzyme Microb. Technol. <u>14</u> (1992) R.N. Patel et al. "Stereoselective reduction of β -keto esters by Geotrichum candidum" p. 731-738	1 - 46

719
AAGGGCGCCCTTGTGTTACGGCCTCCATGTCTGGCCACATTGTGAACGTGCCCCAGTTC
LysGlyAlaLeuValPheThrAlaSerMetSerGlyHisIleValAsnValProGlnPhe
779
CAGGCCACGTACAACGCGGCCAAGGCTGGCGTGCGCCACTTCGCGAAGTCGCTGGCCGTC
GlnAlaThrTyrAsnAlaAlaLysAlaGlyValArgHisPheAlaLysSerLeuAlaVal
839
GAGTTCGCGCCGTTCGCGCGCGTGAACTCTGTGTCGCCGGGCTACATCAACACGGAGATC
GluPheAlaProPheAlaArgValAsnSerValSerProGlyTyrIleAsnThrGluIle
899
TCGGACTTCGTGCCCCAGGAGACGCAGAACAAAGTGGTGGTCGCTCGTGCCCCCTTGGCCGC
SerAspPheValProGlnGluThrGlnAsnLysTrpTrpSerLeuValProLeuGlyArg
959
GGCGGAGAGACGGCCGAGCTCGTTGGCGCCTACCTGTTCTTGCATCTGACGCCGGGCTCG
GlyGlyGluThrAlaGluLeuValGlyAlaTyrLeuPheLeuAlaSerAspAlaGlySer
1019
TACGCCACTGGTACGGACATCATTGTTGACGGTGGCTACACGCTTCCCTAAGCGGCGTGC
TyrAlaThrGlyThrAspIleIleValAspGlyGlyTyrThrLeuPro***
1079
CGAAAACATAGAGCTATCTATATAACCATAATGATGCGCATATTATGATCTACTACTTTG
1139
ACTTCGATCGGAACTTAGGAACGATAAGGGTGGAATGCGTGAAAGCGTGCGATGCTGCAGA
1199
GCGGTGTAATCGGCAGGGCTGTAGGGTGCCTGAGGCGGCGGGCCAGCAGTGCATGTAACC
1259
GGAGCTGAAGCGGAGGCACACATTGCGATGCAGCGAAGCACGGCCGCCAGAACTCTTTGA
1310
GAACAAGCGCGGCCCTCGACTATGCAGCGGCAACAAGCGAATTC

1 / 1 / 2

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP97/03051

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁴ C12N9/02, C12N15/53, C12N15/63, C12N1/21, C12P7/62 // (C12N9/02, C12R1:91), (C12P7/62, C12R1:91)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁴ C12N9/02, C12N15/53, C12N15/63, C12N1/21, C12P7/62

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN)
GENETYX

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 61-146191, A (鍾淵化学工業株式会社) 3. 7月. 1986 (03. 07. 86) (ファミリーなし)	1-46
A	JP, 6-38776, A (味の素株式会社) 15. 2月. 1994 (15. 02. 94) & US, 5413921, A	1-46
A	JP, 6-209782, A (ダイセル化学工業株式会社) 2. 8月. 1994 (02. 08. 94) & EP, 606899, A2 & US, 5559030, A & CA, 2113240, A	1-46
A	JP, 8-336393, A (三菱化学株式会社) 24. 12月. 1996 (24. 12. 96) & EP, 737751, A2	1-46
A	JP, 63-304991, A (鍾淵化学工業株式会社) 13. 12月. 1988 (13. 12. 88) (ファミリーなし)	1-46

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に関する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

09. 12. 97

国際調査報告の発送日

24. 12. 97

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田中 美奈子

4B

9548

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Enzyme Microb. Technol. 15 (1993) J. Peters et al 「A novel NADH-dependent carbonyl reductase with an extremely broad substrate range from Candida parapsilosis : Purification and characterization」 p. 950-958	1-46
A	Enzyme Microb. Technol. 14 (1992) R. N. Patel et al 「Stereoselective reduction of β -keto esters by Geotrichum candidum」 p. 731-738	1-46